

THESIS

MUNICH

1967

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ZUR DIFFERENZIERUNG
DER CHOLINESTERASEAKTIVITÄT
IM MENSCHLICHEN SERUM

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

Dieter Josef Otto } Balser

AUS DER CHIRURGISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. F. Holle

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ZUR DIFFERENZIERUNG
DER CHOLINESTERASEAKTIVITÄT
IM MENSCHLICHEN SERUM

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dieter Josef Otto Balser
aus München

München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. - Doz. Dr. Th. GÜRTNER
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. F. HOLLE
Dekan:	Prof. Dr. F. HOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 7.11.1967

M E I N E N E L T E R N



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTS ÜBERSICHT

I. EINLEITUNG	5
II. AUFGABENSTELLUNG	9
III. METHODIK:	10
1. Die trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese	10
a. Prinzip	10
b. Durchführung	10
2. Die Sephadex-Gel-Filtration	12
a. Prinzip	13
b. Durchführung	14
3. Bestimmung der Enzymaktivität	15
a. Methode nach KALOW und LINDSAY (Substrat Benzoylcholin)	16
b. Methode nach HESTRIN und METCALF (Substrat Acetylcholin)	17
IV. EXPERIMENTELLER TEIL UND ERGEBNISSE:	19
1. Auftrennung mit der trägerfreien Elektrophorese:	19
a. Einleitung	19
b. Gruppe I - Benzoylcholinesterase im nicht aufgetrennten und aufgetrennten Serum	21
c. Gruppe II - Herstellung eines Enzympräparates	23
d. Gruppe III - Benzoylcholinesterase und Acetylcholinesterase im nicht aufgetrennten und aufgetrennten Serum	25

2. Auftrennung mit der Sephadex-Gel-Filtration;	27
a. Einleitung	27
b. Gruppe I - Auftrennung von Serumfraktionen mit Sephadex G-25 bis G-100	27
c. Gruppe II - Auftrennung von Serumfraktionen und Vollserum mit Sephadex G-200	34
 V. DISKUSSION	 39
 VI. ZUSAMMENFASSUNG	 45
 VII. LITERATURVERZEICHNIS	 47
 VIII. LEBENS LAUF	 55

EINLEITUNG:

Vor mehr als vierzig Jahren hat LOEWI (47) mit seinen klassischen Versuchen dargestellt, daß das von A. v. BAYER bereits 1867 synthetisierte Acetylcholin eine der wichtigsten Wirksubstanzen des menschlichen Organismus ist. Mit der revolutionierenden Entdeckung von der "hormonalen Übertragbarkeit der Herz-wirkung" durch den "Vagusstoff" nahm auch die Erforschung um den Abbau dieses Wirkstoffs ihren Ausgang. Nachdem schon DALE (11) 1914 vermutet hatte, daß im Blut ein Stoff vorhanden sei, der das Acetylcholin "zerstöre", da er nach i. v. Gabe von Acetylcholin nur eine kurzfristige Blutdrucksenkung beobachtet hatte, fanden STEDMAN und EASSON (66) 1932 ein Acetylcholin spaltendes Ferment, das sie "Cholinesterase" nannten. Sie hatten durch fraktionierte Fällungen mit Ammoniumsulfat, Adsorption an Aluminiumhydroxyd bei schwach saurer Reaktion und Elution bei einem p_H 8,0 dieses Rohpräparat gewonnen.

Seit dieser Zeit sind die Plasmaesterasen Gegenstand von Forschung und Spekulation. NACHMANN SOHN und AMMON (54, 2) schufen in den nächsten Jahren die wichtigsten methodischen Grundlagen und kamen bereits zu bedeutsamen Ergebnissen über die Natur dieses Ferments. AMMON (2) hat das Verdienst, unter Zuhilfenahme der WARBURG-Apparatur 1933 mit die erste exakte gasanalytische Meßmethode angegeben zu haben.

Schon 1938 hatten WERLE und UEBELMANN (74) bei Versuchen mit der Blutegeßrückenmuskulatur festgestellt, daß die Ansprechbarkeit dieses Modells für Acetylcholin im sauren Milieu bis etwa zum p_H 5,0 verbessert wird. Dieser Effekt war unabhängig von der Art der Säuren, sofern nur dieselben H-Ionenkonzentrationen erzeugt wurden. Sie schlossen daraus, daß eine im Blutegeßrückenmuskel vorhandene "Acetylcholinesterase", die bei einem p_H von 8,0 bis 8,5 ein ausgeprägtes Aktivitätsoptimum besitzt, während sie beim p_H 5,0 einerseits und im alkalischen Milieu bei p_H 11,0 andererseits praktisch wirkungslos ist, das zugeführte Acetylcholin je nach p_H mehr oder weniger schnell spaltet. Damit war schon 1938 die Wirkung einer spezifischen Acetylcholinesterase erkannt worden und bereits eine wesentliche Eigenschaft dieses Enzyms, nämlich die Abhängigkeit der Aktivität vom p_H eindeutig bewiesen.

Aus einer Flut von Publikationen in den kommenden Jahren wurde allmählich klar ersichtlich, daß im menschlichen Serum eine ganze Reihe von esterspalt-

tenden Fermenten vorhanden ist. RICHTER und CROFT (62) wiesen bereits 1942 darauf hin, daß die Cholinesterasen sich von anderen, "einfachen" esterspaltenden Fermenten ("Aliesterasen") unterscheiden, und zwar durch ihre Hemmbarkeit durch 10^{-5} M Physostigmin. Man begann, diese Enzyme nach der Art ihrer Substrate und Inhibitoren zu charakterisieren. Die Differenzierung beruhte hauptsächlich auf Arbeiten mit Nativ-Plasma oder mit rohen Organextrakten. Bei der sogenannten "Plasmacholinesterase" gelang es schon relativ früh, Präparate zu schaffen, in denen das Ferment angereichert war. Nach dem Pferdeserum, das STEDMAN und seine Mitarbeiter (66) benutzten, war es vor allem das elektrische Organ von *Torpedo marmorata*, aus dem NACHMANSON und LEDERER (54) 1939 erstmals Enzymkonzentrate zubereiteten. AUGUSTINSSON (5) trennte 1944 als erster elektrophoretisch im Pferdeserum eine "Serumcholinesterase" von einer "Erythrozytencholinesterase" ab. Obwohl MENDEL, MUNDELL und RUDNEY (50) schon 1943 eine "wahre" und eine "Pseudo-Cholinesterase" anhand der Hemmbarkeit durch Eserin unterschieden, wird noch heute, besonders im klinischen Bereich, ganz allgemein von der "Cholinesteraseaktivität" gesprochen. Auch LANG (43) wies noch 1963 in einem klinischen Erfahrungsbericht eindringlich auf die Unterschiede dieser Enzyme und deren völlig verschiedene Wirkungsmechanismen hin.

Die "Pseudocholinesterase", eine unspezifische Cholinesterase, die die verschiedensten Namen trägt (nach dem Bericht der Enzymkommission [†]) "Acylcholin-Acyl-Hydrolase EC 3.1.1.8), ist ein in der Leber gebildetes Plasmaenzym, wie auch die vergleichenden serologischen und enzymhistochemischen Untersuchungen von GÜRTNER, KREUTZBERG und DOENICKE (25) eindrucksvoll bestätigen.

Im Gegensatz zur spezifischen oder "echten" Acetylcholinesterase (Acetylcholin-Hydrolase EC 3.1.1.7), deren Aktivität für das Funktionieren aller cholinergischen Synapsen im Organismus nötig ist, scheint die Pseudocholinesterase nach den bisherigen Forschungsergebnissen keine nennenswerte physiologische Rolle zu spielen. Dies zeigt u. a. ein von DOENICKE, GÜRTNER und Mitarbeitern (13) untersuchter Fall von Aenzymie der Serumcholinesterase, bzw. Benzoylcholinesterase, die mit einem normalen Gesundheitszustand völlig vereinbar ist. Nur bei Gabe von Succinylcholin und eventuell auch anderer Cholinester können lebensgefährliche Komplikationen auftreten.

Auf die großen Unterschiede in der Gruppe der Cholinesterasen hatten 1959 PILZ und HÖRLEIN (60) nach reaktionskinetischen Untersuchungen und Hemmversuchen ebenfalls aufmerksam gemacht.

[†]) Report of the Commission of the international union of Biochemistry Oxford (1961)

Über Natur und chemischen Aufbau dieser Enzyme oder Enzymgruppen ist trotz vielfältiger, eingehender Untersuchungen nur wenig bekannt (GÜRTNER 1966 (23)). Im Gegensatz zu anderen Enzymen, deren Platz und Funktion im Stoffwechselgeschehen des menschlichen Organismus bereits genau definiert ist, und deren chemische Konstitution teilweise schon geklärt ist, gehen die Meinungen über den Aufbau und die Wirkungsweise der Cholinesterasen noch sehr weit auseinander. Eine besondere Schwierigkeit bei der Fortführung dieser Untersuchungsergebnisse der einzelnen Autoren kaum zueinander in Relation zu setzen sind, da die dabei benutzten Untersuchungsmethoden und Substrate erheblich untereinander differieren.

Da die Cholinesterasen neben ihrer spezifischen "Wirkgruppe" wie alle anderen Enzyme ein Protein als kolloidalen Träger besitzen, lag es nahe, anhand dieses Apoferments, das für die spezifische Wirksamkeit eines Enzyms ebenso wichtig ist, wie das Coferment, diese Enzymgruppe zu untersuchen, nachdem hinsichtlich der Differenzierung durch verschiedenste Substrate noch immer keine Einigkeit herrscht.

Bis jetzt ist nur von wenigen Proteinen die genaue chemische Konstitution bekannt. Deshalb beruhen die gebräuchlichen Methoden zur Differenzierung weitgehend auf rein physikalischen Eigenschaften dieser Körper. Bei chemischen Analysen kommen unter anderem Fällungsmethoden zur Anwendung. So haben SURGENOR und ELLIS (69) 1954 nach dem Verfahren von COHN (10) versucht, durch Aethanol-Fraktionierung bei niederen Temperaturen aus dem menschlichen Serum Zonen zu präparieren, in welchen die Cholinesterase angereichert ist. MALMSTRÖM und Mirabaster (48) fanden 1956 bei der Auftrennung von Serum mittels der Säulenchromatographie, daß die "Cholinesterase" (Enzymbestimmung nach HESTRIN (31), Substrat Butyrylcholinjodid) in der DOWEX-2-Säule bei gleicher Pufferkonzentration zwar zusammen mit den alpha-2-Globulinen eluiert wird, daß aber bei der Auftrennung mit Hydroxylapatit die Hauptzonen des UV-absorbierenden Materials nicht mit den Zonen höchster Enzymaktivität zusammenfallen. Auch bei mehrmals gereinigten Fraktionen war das Material nicht homogen.

AUGUSTINSSON (7) lokalisierte mit einer mit Zellulosepulver gefüllten Präparativsäule, an der ein elektrisches Feld von 60 mA und 260 V angelegt war, eine typische "Butyrylcholinesterase" von niedriger Spezifität, die auch Benzoylcholin und Succinylcholin spaltete, zwischen den alpha-2-Globulinen und den beta-Globulinen. Bei Fraktionierung des Serums mit Ammoniumsulfatlösung fand sich die Cholinesterase jedoch nur im Bereich der Albumine. Butyrylcholin und Benzoylcholin, die als spezifische Substrate der Serumcholinesterase gelten, werden von der Acetylcholinesterase, deren spezifische Substrate Acetylcholin und Acetyl-beta-methylcholin sind, unter physiolo-

gischen Bedingungen nicht gespalten (BREUER und SCHÖNFELDER 1961 (9)).

HAGIWARA (s. 63) fand 1960 in Leberhomogenaten verschiedener Tierspezies und auch beim Menschen eine unspezifische Cholinesterase, die Benzoylcholin, Butyrylcholin und Acetylcholin in dieser Reihenfolge verschieden stark spaltete, daneben aber eine spezifische Benzoylcholinesterase, die kein Acetylcholin spaltete. Diese beiden Enzyme ließen sich signifikant durch Hemmversuche mit Eserin, Quinacrin und Quinin unterscheiden. Ebenso hatten sie verschiedene p_H -Optima, nämlich p_H 8,0 für die unspezifische und p_H 7,6 für die Benzoylcholinesterase.

1963 versuchten HARRIS und ROBSON (29) mit Hilfe der von PORATH und FLODIN (59) 1959 ausgearbeiteten Gel-Filtration erstmals, die Cholinesterasen des menschlichen Serums aufzutrennen. Sie glaubten dabei, die von ihnen und HOPKINSON (28) schon mit der Stärkegelelektrophorese dargestellten und als C_1 bis C_4 bezeichneten Cholinesterasen ebenfalls nach der Molekulargröße differenzieren zu können.

Klinische Erfahrungen, die nach Einführungen von Routinemethoden zur Bestimmung der Cholinesterasen im Serum gewonnen wurden, erbrachten nicht minder verwirrende Ergebnisse, besonders nach Entdeckung der sogenannten "atypischen" Formen der Serumcholinesterase durch KALOW und GENEST (39), HARRIS und WHITTACKER (75), LEHMANN (44), LIDELL (45), FOLDES (18) und andere. Man weiß heute, daß für diese Geno- und Phänotypen vier allele Gene bestimmend sind, nämlich normales, dibucainresistentes, fluoridresistentes und "silent-gene"-Allel (GOEDDE (21)).

1964 konnten RUBINSTEIN und Mitarbeiter (63) bei Menschen mit stark herabgesetzter Cholinesteraseaktivität eine noch unbekannte, fettlösliche, fluoreszierende Substanz finden, die man auch im Harn normaler Menschen beobachtet, deren Cholinesterasen durch den Hemmstoff Pyridostigmin blockiert ist. Man glaubt, daß die Serumcholinesterase durch Abbau der im Stoffwechsel anfallenden unspezifischen Cholinester eine gewisse Schutzfunktion für die Acetylcholinesterase übernimmt.

AUFGABENSTELLUNG :

Das Phänomen differenter und multipler Formen im Bereich der Enzyme und ihrer Proteine ist in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher Publikationen gewesen. Die biochemische und genetische Bedeutung dieser "Isoenzyme" wurde vielfach beschrieben. Die quantitativen bzw. halbquantitativen biochemischen und physikalisch-chemischen Daten wurden dabei im wesentlichen aus der Untersuchung qualitativ separierter Präparationen gewonnen oder mittelbar aus dem Verhalten der Isoenzymgemische abgeleitet. Auch bei den sehr unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Eigenschaften der Cholinesterasen rückt die Überlegung in den Vordergrund, diese Fermentgruppe durch neue Untersuchungsmethoden weiter zu differenzieren. Eine eindeutige Unterscheidung könnte natürlich nur die quantitative Trennung der einzelnen Isoenzymfraktionen und deren exakte physikalisch-chemische Analyse liefern.

Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe zweier physikalischer Trennmethoden (kontinuierliche trägerfreie Elektrophorese und Gelfiltration) die im menschlichen Serum vorhandenen Cholinesterasen zur Darstellung zu bringen und ihre Relation zu den einzelnen Eiweißfraktionen zu untersuchen. Dabei soll vor allem auch auf die Unterschiede zwischen Acetylcholinesterase und Benzoylcholinesterase eingegangen werden. Daß die Gelfiltration ein Trennverfahren nach der Molekülgröße darstellt, wird auch die Frage der Größe der einzelnen Enzyme kurz gestreift.

M E T H O D I K :

1. DIE TRÄGERFREIE KONTINUIERLICHE ELEKTROPHORESE:

Die bereits von NERST (56) 1897 beschriebene und dann von TISELIUS (71) 1937 übernommene Methode, in einem U-Rohr Substanzen elektrophoretisch zu trennen, die eine elektrische Ladung tragen, war zugleich auch die erste "trägerfreie" Elektrophorese, nachdem schon lange zuvor HITTORF (52) 1853 diese Möglichkeit erkannt und experimentell genutzt hatte. Allerdings ist es bei der auch heute noch teilweise in Anwendung befindlichen TISELIUS-Methode nur möglich, durch vorsichtiges Abpipettieren die schnellste und die langsamste Fraktion aus den Schenkeln des U-Rohres zu gewinnen. Bahnbrechend für die klinische Verwendbarkeit der Serumauftrennung war die Einführung der Papierelektrophorese durch KÖNIG (70) 1937. In dem Bestreben, auswertbare Fraktionen dieser Auftrennung zu gewinnen, ging man schon bald dazu über, andere Träger zu verwenden (Agar, Stärkegel, Polyacrylamidgel und andere). Da die Kapazität dieser Trägersubstanzen der Gewinnung von Einzelfractionen Grenzen setzte, versuchten DOBRY und FINN (12) 1958, Trennungen in homogenen Lösungen durchzuführen. Im gleichen Jahr beschrieben BARROLLIER, WATZKE und GIBIAN (72) die von HANNIG und GRASSMANN (22) bereits 1949 eingeführte und dann vervollkommnete Methode der trägerfreien elektrophoretischen Auftrennung von Vielkomponentengemischen.

Prinzip:

Quer zu den Kraftlinien eines elektrischen Feldes strömt in einer durch zwei Glasplatten gebildeten, sehr flachen "Cuvette" eine Elektrolytlösung, der das aufzutrennende Gemisch kontinuierlich zugeführt wird. Die einzelnen Komponenten werden während ihres Laufes je nach ihrer Oberflächenladung verschieden von ihrem geraden Durchfluß abgelenkt und können am Ende des Systems getrennt voneinander an verschiedenen Stellen entnommen werden.

Durchführung:

Wir bedienten uns bei unseren Untersuchungen der von der Firma BENDER & HOBEIN nach Angaben von HANNIG (26) gebauten Apparatur.

In einer aus zwei Glasplatten (50 x 50 cm) und einem U-förmigen Filzstreifen (0,5 mm Dicke) gebildeten "Cuvette" fließt ein Pufferfilm, dessen konstante Laufgeschwindigkeit durch sechs über eine Schlauchpumpe geführte Zuführungen am oberen Ende der Anordnung gewährleistet wird. Quer zu diesem Pufferfilm ist mit Hilfe von ebenfalls pufferumspülten Platinelektroden ein elektrisches Feld angelegt, dessen Stärke durch Änderung der Volt und Ampère variierbar ist. An dem der Pufferzuführung entgegengesetzten Ende der Kammer sind 49 kleine Leisten nebeneinander so angeordnet, daß der Pufferfilm genau in 48 Fraktionen aufgeteilt wird. Aus den sich anschließenden Auffangrohrchen wird durch ein Magnetventil mit Zeitschaltuhr in kurzen Abständen die angesammelte Flüssigkeit in 48 Auffanggefäße abgesaugt. Durch Kühlung der Glasplatten mit Kaltluft von -10°C bis -35°C wird ein Heißwerden und Durchbiegen der Glasplatten vermieden und ein homogenes elektrisches Feld aufrechterhalten. Das zu trennende Substanzgemisch kann durch verschiedene Öffnungen in Höhe der Pufferzuführung mit Hilfe einer Dosiervorrichtung eingebracht werden. Für Serum beträgt die Kapazität dieser Apparatur ungefähr 1,5 g Protein (etwa 20 ml Serum) pro 24 Stunden. Analog zu anderen Elektrophoresesystemen wird Serum nahe der Kathode aufgetragen. Während des Laufs durch die Kammer werden die Albumine in gleicher Weise wie bei der Papierelektrophorese am weitesten zur Anode abgelenkt. Bei der Einstellung des elektrischen Feldes ist darauf zu achten, daß die am schnellsten wandernden Komponenten nicht zu weit abgelenkt werden und so in die Elektrodenkammern abfließen. Bei unseren Serumauftrennungen erwiesen sich 2300 V und 160 mA (= 368 W) als am besten geeignet. Die Ablenkung ist gleichzeitig abhängig von der Geschwindigkeit des Pufferfilmes, bzw. von der Dosierung der zu untersuchenden Substanz. Je schneller diese beiden Flüssigkeiten die Kammer durchlaufen, desto weniger werden sie abgelenkt. Diese Laufgeschwindigkeit ist also mit der Stromstärke des elektrischen Feldes jeweils abzustimmen. Bei unseren Auftrennungen war die Pufferpumpe auf 9 1/2 Umdrehungen eingestellt, die Dosierpumpe für das Untersuchungsmaterial auf 1,6 ml pro Stunde. Mit dieser Einstellung wurden die jeweiligen Seren fast über die gesamten 48 Kammern aufgetrennt. Der als Laufmittel verwendete Puffer kann je nach dem Zweck der Untersuchung ausgewählt werden. Bei unseren Auftrennungen bedienten wir uns des Tris-Puffers (Trishydroxymethylaminomethan, pH 8,6) bzw. des SÖRENSEN-Phosphat-Puffers (pH 7,4). Je nach der spezifischen Leitfähigkeit des Puffers (beim Tris-Puffer $0,0016 \cdot \text{cm}^{-1}$) muß wiederum die Stromstärke des elektrischen Feldes korrigiert werden.

Technische Schwierigkeiten bei jeder präparativen Elektrophorese bereitet vor allem die Ableitung der dabei auftretenden JOULE'schen Wärme und damit

die Vermeidung von Konvektionsströmungen. Speziell für unsere enzymatischen Untersuchungen erwies sich bei der doch relativ langen Laufdauer die Kühlung des Systems als sehr vorteilhaft. Bei einer konstanten Temperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ im gesamten Trennvorgang einschließlich des Substratvorratgefäßes und des Fraktionssammlers kam es nicht zu Aktivitätsverlusten infolge zu hoher Temperatur.

2. DIE SEPHADEX-GEL-FILTRATION:

TURBA und Mitarbeiter (72) gelangten 1960 nach eingehenden Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß hochmolekulare Proteine in den Kunstharsaustauschern denaturiert und dann irreversibel gebunden werden können. Dieser Effekt erklärt sich aus dem komplizierten Gefüge der Eiweißkörper, die aus einer Vielzahl von Aminosäuren zusammengesetzt sind, und deren Peptidketten dann nochmals in sich geknäult oder zu einer alpha-Helix gewunden sein können. Diese Tertiärstruktur wird schon unter relativ milden Milieuänderungen zerstört, wobei nicht nur die biologische Aktivität eingebüßt wird, sondern auch zusätzliche reaktionsfähige Gruppen aus dem Molekülinneren (bei intaktem Molekül liegt die Masse dieser reaktionsfähigen Gruppen an der Oberfläche) frei werden, die mit dem Ionenaustauscher unspezifische, irreversible Bindungen eingehen. Erst mit der Einführung der Zellulose-Ionen-Austauscher durch PETERSON und SOBER (57) 1956 konnten strukturempfindliche Proteine in ionenarmem Milieu bei relativ günstigen pH -Werten ohne Veränderung aufgetrennt werden. Aber auch diese Fraktionierung auf der Basis des Ionenaustauschs beruht auf der Anzahl der Ladung der auf der Moleküloberfläche dissoziierten Gruppen, und es besteht somit eine gewisse Ähnlichkeit des Fraktionierungsprinzips mit der Elektrophorese, da auch im elektrischen Feld die Auftrennung nach der effektiven Nettoladung, die eine Funktion des pH -Wertes ist, erfolgt. So werden Proteine von einer DEAE-Säule weitgehend in der Reihenfolge ihrer zunehmenden elektrischen Beweglichkeit eluiert, angefangen mit den gamma-Globulinen. Es war daher naheliegend, auch andere Unterscheidungsmerkmale zur Auftrennung eines Proteingemisches heranzuziehen. SYNGE und TISELIUS (70) führten 1950 erste Versuche mit Stärke und Agar durch, Proteine nach ihrer Größe zu trennen. Aber erst PORATH und FLODIN (59) war ein durchschlagender Erfolg beschieden. Sie entwickelten 1959 durch Quervernetzung von Dextran ein Gel, das einen ausgezeichneten Molekularsiebeffekt besitzt. Durch sie wurde die Gelfiltration mit SEPHA-

DEX⁺⁾ innerhalb weniger Jahre zu einem Routineverfahren. Die Trockensubstanz des Sephadex besteht aus Perlen, die durch Vernetzung großer Dextranmoleküle gewonnen werden. Aufgrund seiner vielen Hydroxylgruppen ist es außerordentlich hydrophil. Die zur Herstellung des Gels in wässrigen Lösungen eingeweichten Perlen quellen unter Wasserbindung stark auf. Das Wasserbindungsvermögen ist vom Grad der Vernetzung abhängig. Mit zunehmender Vernetzung wird die Porengröße der einzelnen Partikel geringer, wobei die Wasserkapazität direkt proportional abnimmt. Nach diesen Gesichtspunkten wird Sephadex zur Zeit in fünf verschiedenen Größen hergestellt:

Sephadex- Typ:	Ausschlußgrenze nach Molekulargewicht:	Wasseraufnahmevermögen pro g Trockenprodukt:
G-25	5.000	2,5
G-50	10.000	5,0
G-75	50.000	7,5
G-100	100.000	10,0
G-200	200.000	20,0

Typ G-25 z.B. ist zu einem so engen Sieb vernetzt, daß das Innere der Perlen nur sehr kleinen Molekülen bis zu dem Molekulargewicht 5.000 zugänglich ist.

Einer der Hauptvorteile des Sephadexgels ist die weitgehende chemische Indifferenz, so daß eine Auftrennung lediglich nach Größe und Form des Moleküls erfolgt und eine Beeinträchtigung der hochempfindlichen Serumeiweißkörper an chemisch reaktiven Gruppen ausgeschlossen ist.

Prinzip:

Kleinere Moleküle, die durch das Netzwerk der Polydextranperlen einzudringen vermögen, haben einen längeren Elutionsweg, als hochmolekulare Komponenten, die zwischen den Partikeln die Säule durchwandern. Es handelt sich also um eine Art Verteilungschromatographie.

Für die Fraktionierung von Plasmaproteinen eignen sich analog der Ausschlußgrenze vor allem die Sephadex-Typen G-100 und G-200, da die meisten Eiweißkörper des Plasmas ein Molekulargewicht größer als 50.000 besitzen. FLODIN und KILLANDER (17) trennten an einer G-200-Säule Nativserum in

^{+) Herstellerfirma Pharmacia Uppsala Schweden}

drei Fraktionen auf. Die Analyse der Eluatzenen in der Ultrazentrifuge zeigte, daß die Trennung weitgehend nach dem Molekulargewicht erfolgte:

1. Gipfel:	2. Gipfel:	3. Gipfel:
γ -1-Makroglob.	7S- ⁺ -Glob.	Albumin
β -Lipoprotein	β_1 -C-Glob.	7S- -Glob.
2-Makroglob.	β_1 -A-Glob.	Transferrin
Haptoglobin	β -Lipoprotein	Antitrypsin
	Coeruloplasmin	

Durchführung:

Die als Trockenpulver gelieferte Sephadex-Substanz muß zunächst aufgequollen werden. Dies geschieht am besten mit aqua dest. Die stark vernetzten Typen G-25 und G-50 quellen innerhalb von 2-3 Stunden vollständig. G-75 soll etwa 24 Stunden vor dem Einfüllen angesetzt werden. Bei G-100 und besonders bei G-200 ist einer sorgfältigere Vorbereitung notwendig. Man kann entweder in aqua dest. oder in 4-6 M Harnstoff- oder Guanidinhydrochloridlösung das Trockenpulver quellen lassen. Wir bevorzugten aqua dest., wobei wir unter häufigem vorsichtigem Umrühren die jeweilige Menge drei bis vier Tage stehen ließen und dann die Suspension mit der gewünschten Pufferlösung auswuschen. Die Wahl des Chromatographierohres hängt von der Menge des Stoffgemisches, wie auch von der Art des Trennproblems ab. Bei nur geringen Molekulargewichtsunterschieden der einzelnen Komponenten, wie z.B. bei Serumauftrennungen, sollte eine möglichst lange Säule benutzt werden. Dabei besteht bei zu großer Höhe des Gelbettes die Gefahr, daß die Durchflußgeschwindigkeit durch Kompression des Gels vermindert wird. Wir benutzten bei unseren Auftrennungen je nach Geltyp verschiedene Säulen bis zu einer Länge von 100 cm und einem Durchmesser von 2,4 cm.

Beim Einbringen des Gels wurde die Säule zunächst mit dem jeweiligen Puffer gefüllt und an der Ausflußöffnung ein Schlauch angebracht, der nach Art eines kommunizierenden Gefäßes bis in die gewünschte Gelbetthöhe hochgehalten wurde. Das eingebrachte Gel sinkt auf diese Weise nur langsam ab und die noch vorhandenen Luftbläschen werden entfernt. Bei der Füllung ist genau darauf zu achten, daß das Rohr exakt senkrecht steht.

Die zu untersuchende Substanz wurde bei unseren Versuchen mit einer Pipette direkt über dem Gelbett aufgetragen und dabei das darüberstehende Elutionsmittel vorsichtig unterschichtet. Das anfallende Eluat wurde mit dem Fraktions-

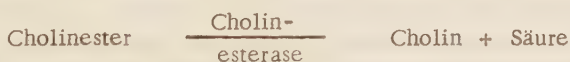
sammler in Proben zu 2,5 bis 5,0 ml aufgetrennt, das Material nach Möglichkeit sofort gemessen, oder im Kühlraum bis zur Verarbeitung aufbewahrt. Nach vollständiger Elution des gesamten aufzutrennenden Materials ist es nicht notwendig, die Säule mit besonderen Maßnahmen wieder zu regenerieren. Sie ist sofort wieder einsatzbereit. Zur Sicherheit haben wir dennoch die Säule nach Beendigung eines Laufs nochmals mit der jeweiligen Pufferlösung einen Tag durchgespült und nochmals Stichproben auf etwa noch vorhandene Substanzen gemacht.

3. BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄT:

Bei unserer Problemstellung war eine Bestimmungsmethode notwendig, die wegen der großen Anzahl der Fraktionen (bei der Säule bis 160) bei einer gewissen Einfachheit der Durchführung uns das Vorhandensein einer Enzymaktivität in ausreichender Genauigkeit zur Darstellung brachte.

Prinzip der Cholinesterase-Bestimmung:

Die Cholinesterasen katalysieren die Hydrolyse von Cholinestern nach folgendem Prinzip:



Daraus ergeben sich grundsätzlich drei Wege zur Bestimmung der stattgehabten Hydrolyse:

1. durch Messung der entstandenen Säure oder einfacher des dadurch veränderten p_H
2. durch Messung des entstandenen Cholins und
3. durch Messung des nicht umgesetzten Substrats.

Eine Vielzahl von Bestimmungsmethoden wurde daraus abgeleitet. In letzter Zeit haben vor allem POCHET (58) 1955, STUMPF (68) 1956 und AUGUSTINSON (4) 1957 zusammenfassend darüber berichtet.

Methode nach KALOW und LINDSAY (40):

Bei dieser auch im klinischen Bereich sehr bewährten Enzymbestimmung wird Benzoylcholin als Substrat verwendet. Die beiden Autoren haben diese Methode, nachdem HOFSTEE (33) sie 1951 erstmals angegeben hatte, 1955 zu einem Routineverfahren ausgearbeitet. Das Prinzip beruht darin, daß Benzoylcholin im UV-Bereich eines Spektrophotometers eine größere Absorption aufweist, als seine Spaltprodukte Cholin und Benzoessäure. Es ist also möglich, nach Einwirkung des Enzyms das noch vorhandene, nicht hydrolysierte Benzoylcholin nach einer bestimmten Zeiteinheit zu messen und den Abfall der Extinktion als Maß für die Höhe der Aktivität zu betrachten. Daraus ergibt sich die Bezugsgröße für die Aktivität des untersuchten Enzyms, nämlich μmol gespaltenes Substrat pro ml enzymhaltiges Material pro Stunde bei einer definierten Temperatur (bei unseren Untersuchungen 26°C).

Untersuchungsgang:

Es sei zunächst der bei Vollserum gebräuchliche Untersuchungsgang geschildert. Das Ausgangsmaterial (Serum) wird 1:100 mit Phosphatpuffer von pH 7,4 verdünnt. Mit dieser Verdünnung werden zwei Cuvetten gleicher Größe (Quarz-Cuvetten von 10 mm Schichtdicke) beschickt. In eine dieser Cuvetten wird das Substrat in Form von 1 ml Benzoylcholinchloridlösung (frische Lösung von $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ in Phosphatpuffer pH 7,4) gegeben, dazu noch 1 ml Phosphatpuffer pH 7,4. Zum Leerwert werden lediglich 2 ml Phosphatpuffer pH 7,4 zugefügt. Sofort nach dem Füllen der Cuvetten wird im BECKMAN DU bei einer Wellenlänge von $240 \mu\text{m}$ im UV-Licht gemessen, die Absorption von Puffer und Serum wird durch den Leerwert kompensiert. Nach genau drei Minuten wird bei selber Wellenlänge der Testansatz nochmals gemessen und der Abfall der Extinktion abgelesen. Eine Differenz von 0,1 (im BECKMAN DU, Schlitzbreite 1,4 mm) entspricht dabei nach den Angaben von KALOW (41) bei 26°C Reaktionstemperatur einer Hydrolyse von $0,01515 \mu\text{mol}$ Benzoylcholin pro ml . Da die enzymhaltige Substanz, in diesem Falle das Serum, im Testansatz 1:200 verdünnt ist und da die Einwirkung des Enzyms auf das Substrat nur in einer Zeit von drei Minuten gemessen wird, muß mit 200 und mit 20 multipliziert werden, um auf die Bezugsgröße zu kommen.

Da der Einfluß der Temperatur sehr maßgebend ist, müssen temperierbare Cuvettenhalter verwendet werden, die auf die einheitliche Temperatur von 26°C einstellbar sind. Unter Berücksichtigung der während der Messung auftretenden Reaktionswärme wird der Endwert nach folgender Formel errechnet:

$$\text{antilog } 0,0283 \cdot (26^{\circ} - t_1) = E \text{ bei } 26^{\circ}$$

dabei ist t_1 gleich der Temperatur am Ende der Reaktion.

Bei den von uns gewonnenen Fraktionen findet eine Verdünnung bereits durch das jeweilige Elutionsmittel statt. Es war daher nicht mehr notwendig, zur Messung nochmals zu verdünnen. Die Serumverdünnung wurde jeweils aus der Menge der aufgetrennten Substanz und aus der Menge des verbrauchten Elutionsmittels errechnet und bei der Messung analog zur Bestimmung im Vollserum berücksichtigt.

Methode nach METCALF und HESTRIN (52):

Auch diese Methode wählten wir nach eingehenden klinischen Erfahrungen aus.

1949 hatte HESTRIN (31) eine kolorimetrische Meßmethode entwickelt. Diese Bestimmungsart ist genau, kann schnell durchgeführt werden und ist so für die Untersuchung von großen Versuchsreihen geeignet. Das Prinzip besteht darin, daß nach Einwirkung der zu untersuchenden Substanz nicht hydrolysiertes Acetylcholin mit alkalischem Hydroxylamid eine Säure bildet, die mit Fe^{III} einen farbigen Komplex ergibt. Dieser Komplex kann im Spektrophotometer bei $540 \mu\text{m}$ gemessen werden. Mit geringen Abänderungen entwickelte METCALF (52) daraus eine Mikromethode für Reihenuntersuchungen bei Arbeitern, die ständig in Kontakt mit Insektiziden vom Typ organischer Phosphatverbindungen (Cholinesterasehemmer) kamen.

Wie bei allen Methoden, die das nicht gespaltene Substrat messen, taucht auch hier das folgende Problem auf: Wir wissen, daß die Wirkung eines Enzyms damit verbunden ist, daß das jeweilige Substrat intermediär an die aktiven Gruppen des Enzyms gekoppelt wird. Zum Zeitpunkt der Messung des verbleibenden Substrats wissen wir also nicht, welcher Teil noch oder nur an das Enzym gebunden ist. Für quantitative Untersuchungen ist dieser Faktor von maßgebendem Einfluß, für unsere rein lokalisierenden und differenzierenden Untersuchungen ist eine Bindung des Substrats für das Vorhandensein des Enzyms ein genügender Beweis.

Die einzelnen Probleme der Methode, wie Substratkonzentration, Präzision der Mikromethode, pH -Wert des Reaktionsmilieus, hat METCALF (52) eingehend geprüft. So hat dieser Autor seine Methode mit verschiedenen Puffern durchgeführt, wobei er feststellen konnte, daß bei dieser Bestimmung unterschiedliche Puffer vom pH 7,2 bis 8,0 nahezu gleiche Ergebnisse erbrachten. GLICK (20) hatte schon 1938 bei seinen Untersuchungen Veronalpuffer vom pH 8,0 ver-

wendet. Obwohl dieser p_H -Wert dem p_H -Optimum der Enzymwirkung näher liegt, ist hier die Spontanhydrolyse ohne Enzymeinwirkung erheblich größer.

Untersuchungsgang:

0,005 ml Serum werden mit 1 ml Acetylcholinbromid (0,004 M Acetylcholinbromid in Phosphatpuffer p_H 7,2 gelöst) 30 Minuten im Wasserbad von 37°C inkubiert. Nach Abkühlung werden 2 ml eines Hydroxylamin-NaOH-Gemisches (2 M Hydroxylamin : 3,5 n NaOH = 1:1), sowie 1 ml HCl (1 Teil HCl D=1,19 + 2 Teile aqua dest.) und 1 ml Fe^{III} -Chlorid (0,37 M Fe^{III} -Chlorid in 0,1 n HCl) zugegeben und das Gemisch sofort im Spektrophotometer (BECKMAN DU) bei einer Wellenlänge von $540\mu\text{m}$ in einer 10 mm Cuvette gegen einen Vergleichswert (0,005 ml Serum erst nach der Inkubation zugegeben) gemessen. Die Extinktion multipliziert mit 100 ergibt die Menge hydrolysierten Acetylcholins pro ml Serum pro Stunde bei 37°C .

Wie schon bei der KALOW'schen Methode wurde auch hier die durch die Auftrennungen entstandene Verdünnung bei den jeweiligen Ergebnissen berücksichtigt.

EXPERIMENTELLER TEIL:

1. AUFTRENNUNG MIT DER TRÄGERFREIEN ELEKTROPHORESE:

Zur Auftrennung gelangten 70 Seren verschiedener Herkunft. Die Nativ-Seren wurden durch Zentrifugieren von jeweils frisch aus einer Armvene entnommenem Blut gewonnen. Sie stammten zum überwiegenden Teil von gesunden Versuchspersonen, teilweise handelte es sich aber um Serum von Patienten, die für eine spezielle Fragestellung ausgewählt wurden.

Bei den ersten 37 Läufen war das gewonnene Serum zunächst in Tris-Puffer pH 8,6 bzw. Phosphatpuffer pH 7,4 12 bis 24 Stunden dialysiert worden. Bei den folgenden Versuchen konnten wir jedoch feststellen, daß es vollauf genügte, das Nativserum im Verhältnis 1:1 bzw. 1:2 mit dem jeweiligen Puffer zu verdünnen. Es fanden sich hierbei die gleichen Ergebnisse. Auch die vorherige Einengung und Wiederlösung in aqua bidest. erwies sich als überflüssig.

Ein Teil der gewonnenen Seren wurde nicht sofort nach der Entnahme aufgetrennt, sondern im Kühlraum bis zu drei Tagen aufbewahrt. Wesentliche Veränderungen in der Aktivität oder gar in der Lokalisation der Enzyme wurden dabei nicht beobachtet.

Auch die Bestimmung des pH in sämtlichen Fraktionen ergab keine nennenswerten Schwankungen.

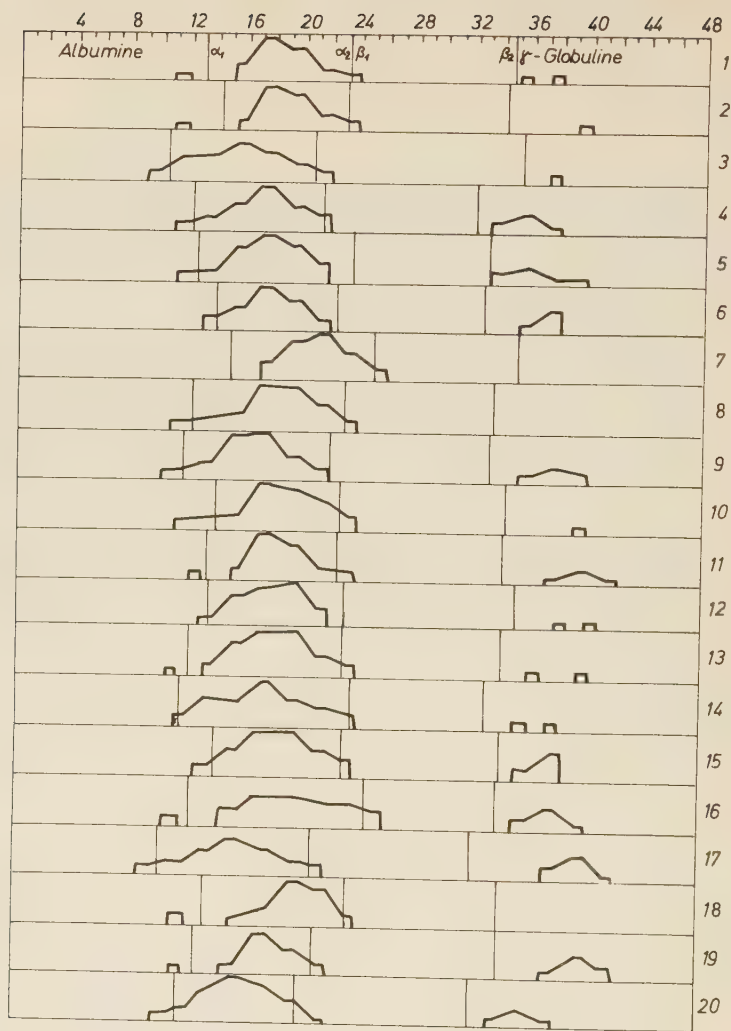


ABBILDUNG 1

Auftrennung von Gesamtserum mit der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese und Lokalisation der Benzoylcholin spaltenden Enzyme (20 Läufe). Senkrechte Striche: Grenzen zwischen den einzelnen Eiweißfraktionen (Albumin / α_1 -, α_2 / β_1 -, β_2 / γ -Glob.). Schraffierte Felder: Zonen der Enzymaktivität.

Gruppe I: Versuch 1-20

Auftrennung von Gesamtseren mit der kontinuierlichen trägerfreien Elektrophorese, Lokalisation der Benzoylcholinhydrolyse nach KALOW.

In diesen ersten Versuchen sollte gezeigt werden, ob es überhaupt möglich war, nach trägerfreier elektrophoretischer Auftrennung des Serums noch eine enzymatische Aktivität festzustellen und die zur exakten Darstellung der Enzymaktivität optimalen Bedingungen herauszufinden.

Folgende Seren mit normaler Form der Serumcholinesterase wurden dabei verarbeitet:

Gesunde Versuchspersonen:	11
Patienten mit alpha-1- und alpha-2-Erhöhung:	2
Patienten mit gamma-Erhöhung:	3
Plasmakonserven:	4

Die gewonnenen Fraktionen wurden zunächst im BECKMAN DU bei $280\mu\text{m}$ einzeln gemessen und ergaben die von der Papierelektrophorese her bekannten typischen Bilder. Allerdings ist hier die Auftrennung genauer und es kommen auch teilweise Fraktionen wie die Präalbumine, die einzelnen beta-Globuline und unterschiedliche gamma-Globuline zur Darstellung.

In sämtlichen gewonnenen Fraktionen wurde zugleich unmittelbar nach der Auftrennung die Aktivität der Benzoylcholinesterase nach KALOW gemessen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 halbschematisch aufgezeichnet. Die schraffierten Bereiche stellen dabei die Enzymaktivität dar, die senkrechten Striche die für die Lokalisation wichtigen Grenzen der Serumeiweißkomponenten.

Damit kann folgendes gesagt werden:

1. Die Enzymaktivität zumindest der Benzoylcholin spaltenden Esterase wird durch die Auftrennung mittels der trägerfreien Elektrophorese trotz der doch erheblichen chemischen und physikalischen Einflüsse und trotz der vorausgegangenen Vorbereitung, insbesondere der Dialyse, nicht erheblich beeinträchtigt. Die im Gesamtserum vorhandene Aktivität findet sich, verteilt auf die "enzympositiven" Proben, fast vollständig wieder. Aussagen über eine Relation zwischen der Aktivität im Ausgangsmaterial und der in den aufgetrennten Proben lassen sich jedoch bei der noch geringen Anzahl der Versuche nicht machen. Die trägerfreie präparative Elektrophorese erscheint daher als ein brauchbares Verfahren zur präparativen Darstellung eines Enzyms, wie der Benzoylcholinesterase, gut geeignet.

2. In allen 20 Auftrennungen wurde die Enzymaktivität im Bezug auf die Eiweißkurve in den gleichen Abschnitten aufgefunden. Wie die Abbildung veranschaulicht, liegen die höchsten Aktivitäten durchweg im Bereich der alpha-

2-Globuline. Die an- und absteigenden Schenkel der Aktivitätskurve schließen immer die alpha-1-Fraktion, das Ende der Albuminfraktion und den Beginn der beta-1-Fraktion mit ein. Ein zweiter Peak von wesentlich geringerer Aktivität findet sich gleichzeitig bei einem gewissen Teil der Auftrennungen im Bereich der gamma-Globuline. Dieses Ergebnis ist bei sämtlichen Versuchen reproduzierbar, völlig unabhängig von der Herkunft des Ausgangsmaterials. Sowohl bei den gesunden Versuchspersonen, als auch bei den Kranken mit Erhöhung bestimmter Fraktionen im Eiweißpherogramm sind die Ergebnisse die gleichen. Sogar in den Plasmakonserven, die doch die Aufbereitungsmaßnahmen erheblich alteriert sind, bleibt die Enzymaktivität in der gleichen Stärke und vor allem in der gleichen Lokalisation erhalten.

Besonders zu vermerken ist, daß auch bei den Patientenserum (vorwiegend chirurgisches Krankengut mit chronischen Leberschäden, Dysproteinämien infolge eines Karzinoms, einer Nephritis oder Nephrose) nach der Auftrennung keine wesentlichen Unterschiede der Verteilung gegenüber dem Serum gesunder Versuchspersonen gefunden werden konnten. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß durch beeinflussende Erkrankungen zwar die Höhe der Aktivität verändert wird, nicht aber die chemischen Eigenschaften des Enzyms.

Für die Benzoylcholinesterasen ergeben sich daraus folgende Merkmale: Die elektrische Ladung dieses Enzymsimplexes bzw. die damit korrelierende Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld entspricht hauptsächlich derjenigen der alpha-2-Globuline, wobei auch Albumin, alpha-1-Globuline und beta-1-Globuline Teile der Enzymaktivität enthalten. Überraschend ist der Befund, daß auch in den gamma-Fraktionen ein vom Hauptpeak völlig getrennter Aktivitätsgipfel auftritt, dessen Wanderungsgeschwindigkeit erheblich geringer sein muß. Da die die Auftrennung beeinflussenden Faktoren (elektrisches Feld, p_H , Wanderungsstrecke usw.) im ganzen System gleich sind, dürfte es sich hier um ein "Isoenzym" handeln, das zwar das gleiche Substrat spaltet, bezüglich seiner chemischen Struktur, zumindest jedoch seiner Oberflächenaktivität, Unterschiede aufweist.

Gruppe II: Versuch 21-50:

Herstellung eines "Enzymkonzentrates" aus Vollserum mit der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese.

Das Ausgangsmaterial stammt wiederum teils von gesunden Versuchspersonen, teils von Patienten.

Nachdem weitere Versuche dieser Serie gezeigt hatten, daß auch durch Variation der Aufbereitung des Materials und durch Änderung der einzelnen Komponenten des Auftrennungssystems in gewissen Grenzen immer wieder das gleiche Bild bezüglich der Aktivität und Lokalisation des Enzyms zu finden war, wurden in sämtlichen Versuchen dieser Serie die enzymtragenden Fraktionen zwischen Albumin und beta-1-Globulinen separiert und vereinigt.

Zusätzlich wurden je 10 ml Serum von weiteren 20 gesunden Versuchspersonen vereinigt, durch die Apparatur aufgetrennt und wiederum die oben genannten Fraktionen herausgenommen. Dieses gesamte Rohpräparat wurde in der üblichen Weise der Gefriertrocknung unterzogen. Als Endprodukt hatten wir ein stark mit Benzoylcholinesterase angereichertes Trockenpräparat in Händen (Aktivität pro mg: 1200 μ mol Benzoylcholin/Stunde bei 26°C), dessen weitere Untersuchung im Teil II dieser Arbeit beschrieben ist.

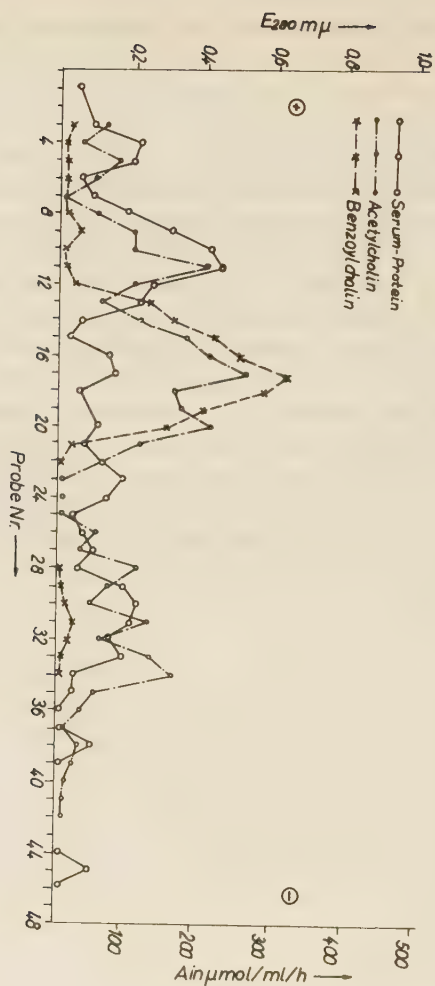


ABBILDUNG 2

Auftrennung von Vollserum mit der kontinuierlichen trägerfreien Elektrophorese (5 ml Serum, E.K. männl.), Tris-Puffer, pH 8,6; 2200 V, 180 mA.
 Fraktionen: 3-6 Präalbumine, 6-11 Albumine, 11-14 alpha 1-Glob., 14-18 alpha 2-Glob., 18-25 beta 1- und beta 2-Glob., 25-36 gamma 1-, gamma 2- und gamma 3-Glob.

Gruppe III: Versuch 51-70:

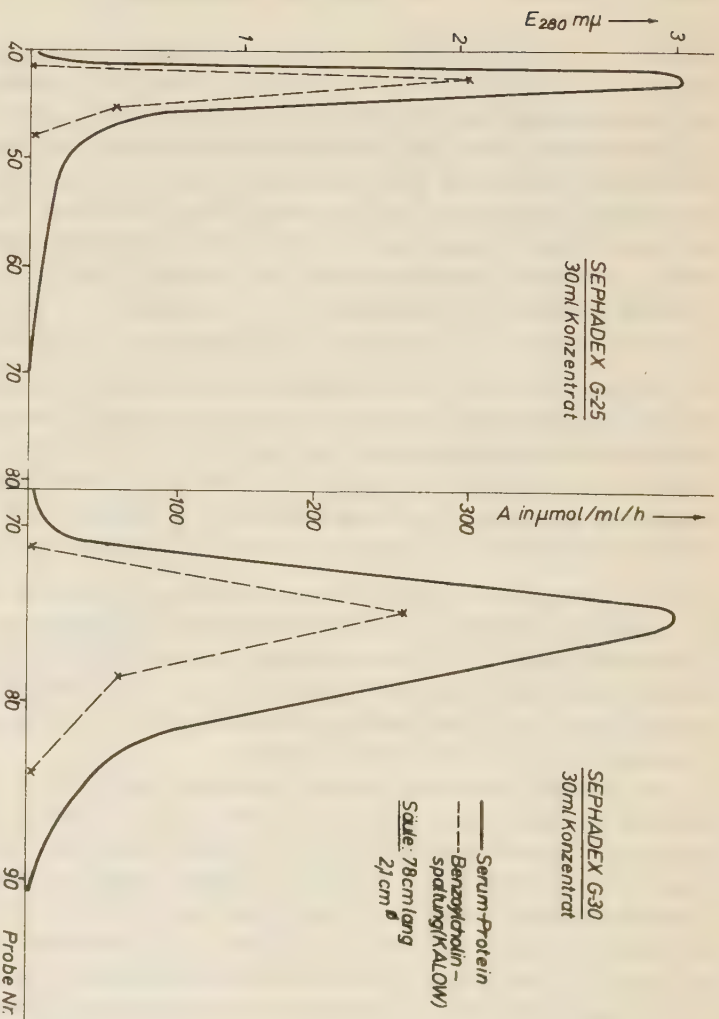
Lokalisation von Benzoylcholinesterase und Acetylcholinesterase nach Auftrennung von Vollserum mit der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese.

Nachdem in den beiden ersten Serien die Benzoylcholin spaltende Esterase lokalisiert war, untersuchten wir nun auch die einzelnen 48 Fraktionen der folgenden Auftrennungen hinsichtlich ihrer Aktivität gegen Acetylcholin. Zur Bestimmung diente uns die von HESTRIN angegebene und von METCALF verfeinerte Methode, die oben bereits beschrieben ist. Das Prinzip der elektrophoretischen Auftrennung wurde im wesentlichen beibehalten. Die Aktivität der Benzoylcholinesterase wurde wieder in der schon beschriebenen Weise lokalisiert. Gleichzeitig wurde aber jetzt auch in sämtlichen Fraktionen jeweils die Aktivität nach METCALF bestimmt. Auch hier gelang es wieder, unter gleichen Bedingungen das in Abbildung 2 wiedergegebene Bild zu reproduzieren.

Im Gegensatz zur Benzoylcholinesterase war die Aktivität des Acetylcholinbromid spaltenden Enzyms praktisch über die gesamte Elektrophoresestrecke verteilt. Deutlich voneinander getrennte Peaks fanden sich immer wieder im Bereich der Albumine (in Abbildung 2 Fraktion 6-12), der alpha-2-Globuline (Fraktion 15-20) und der gamma-Globuline (Fraktion 28-36), wobei auch hier die Aktivität zwischen alpha-2-Globulinen und beta-1-Globulinen am höchsten war.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lassen sich folgende Aussagen machen:

1. Unter den Bedingungen der trägerfreien präparativen Elektrophorese lassen sich sowohl bei p_H 7,4 (Sörensen-Phosphatpuffer) als auch bei p_H 8,6 (Tris-Puffer) mit der METCALFschen Methode der Aktivitätsbestimmung (Substrat Acetylcholinbromid) drei deutlich voneinander getrennte Aktivitätsmaxima darstellen (Fraktion 3-13, 14-23, 25-37).
2. Im Gegensatz zum Benzoylcholin spaltenden Enzym, das nur in zwei voneinander getrennten Bereichen eine Aktivität aufweist, finden sich beim Substrat Acetylcholin drei Aktivitätsgipfel, die sich in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld und damit in ihrer Oberflächenladung wesentlich voneinander unterscheiden. Wir finden diese drei "Isoenzyme" im Bereich der Albumine (wo Benzoylcholin nicht gespalten wird), im Bereich der alpha-2- und beta-1-Globuline (hier mit der Benzoylcholinspaltung zusammenfallend) und im Bereich der gamma-Globuline (Aktivität der Benzoylcholinesterase wesentlich geringer).



ABBIIDUNG 3
Auftrennung von Enzymkonzentrat mit Sephadex G-25 fine
Laufmittel: 1, 1%iger Ammoniumacetatpuffer pH 6,47

ABBIIDUNG 4
Auftrennung von Enzymkonzentrat mit Sephadex G-50
Laufmittel: 1, 1%iger Ammoniumacetatpuffer pH 6,4

2. AUFTRENNUNG MIT DER SEPHADEX-GEL-FILTRATION:

Gruppe I: Sephadex G-25 bis G-100:

Auftrennung eines elektrophoretisch gewonnenen Enzympräparates.

Im ersten Teil dieser Untersuchungen sollte herausgefunden werden, wie sich die Aktivität der Cholinesterasen beim Lauf durch die Gel-Säule verhält. Dazu wurde das mit der trägerfreien Elektrophorese gewonnene Präparat herangezogen. Wie schon gesagt, handelte es sich dabei um jene Fraktionen, die einen Teil der Albumine, die alpha-1-, alpha-2- und beta-1-Globuline enthielten (in Abbildung 2 Fraktion 12-22). Um überhaupt feststellen zu können, ob dieses hoch mit Enzymaktivität angereicherte Präparat unbeschadet die Säule passieren kann, wurden zunächst mit feineren Porengrößen G-25 bis G-100 Probelaufe vorgenommen. Der Trennbereich dieser Gele liegt zwischen 100-5000 und 1000-100000.

Im ersten Lauf mit G-25 fine in einem Gelbett von 87 cm Länge und 2,1 cm Durchmesser erschienen Eiweißbestandteile und Enzyme in einem schmalen Peak zu Beginn des Laufs, das heißt, beide Teile benützten als Weg nur das sogenannte "äußere Volumen" der Säule, da sie wegen ihrer Größe nicht die feinen Poren des Gels durchwandern konnten. Trotzdem als Laufmittel, 1,1 %iger Ammoniumacetatpuffer vom p_H 6,47 verwendet worden war, fand sich die Enzymaktivität im Eluat vollständig erhalten. Wie wir auch in den nachfolgenden Untersuchungen sehen konnten, hatten also das Gel und auch das Elutionsmittel vom p_H 6,47 keinen Einfluß auf die Enzymaktivität (Abbildung 3). Auch im zweiten Lauf, der mit G-50 (Auftrennungsbereich 500 - 10000) durchgeführt wurde, fand sich noch keinerlei Auftrennung, sondern die Enzymaktivität wurde in einem schmalen Peak wiederum zusammen mit dem Eiweiß eluiert (Abbildung 4).

Der dritte Versuch wurde unter den gleichen Bedingungen nur mit G-75 durchgeführt. Der Trennbereich dieses Gels liegt zwischen 1000 und 50000. Damit erhielten wir das in Abbildung 5 gezeigte Bild. Es finden sich zwei nahe beieinander liegende Eiweißgipfel, die jedoch deutlich zu unterscheiden sind. Wie bekannt, ist das Molekulargewicht der Albumine 69000. Es kann also bereits angenommen werden, daß hier eine Auftrennung der Eiweißbestandteile beginnt, und zwar durch Abspaltung der Albumine. Auffallend ist hier schon, daß die nach KALOW gemessene Aktivität nur eine mit dem ersten Eiweißgipfel gleichlaufende Kurve bildet, während im zweiten Gipfel keinerlei Aktivität zu finden ist.

Diese Trennung gelingt im nächsten Versuch (Abbildung 6) noch deutlicher. Ebenfalls mit Sephadex G-75 und mit Ammoniumacetatpuffer p_H 8,2 wurden

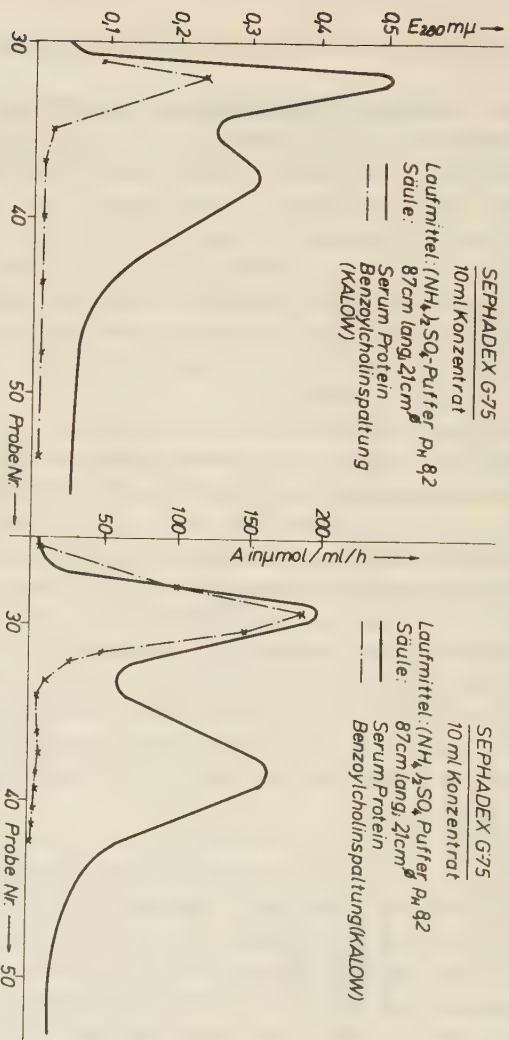


ABBILDUNG 5

Auftrennung von Enzymkonzentrat mit Sephadex G-75

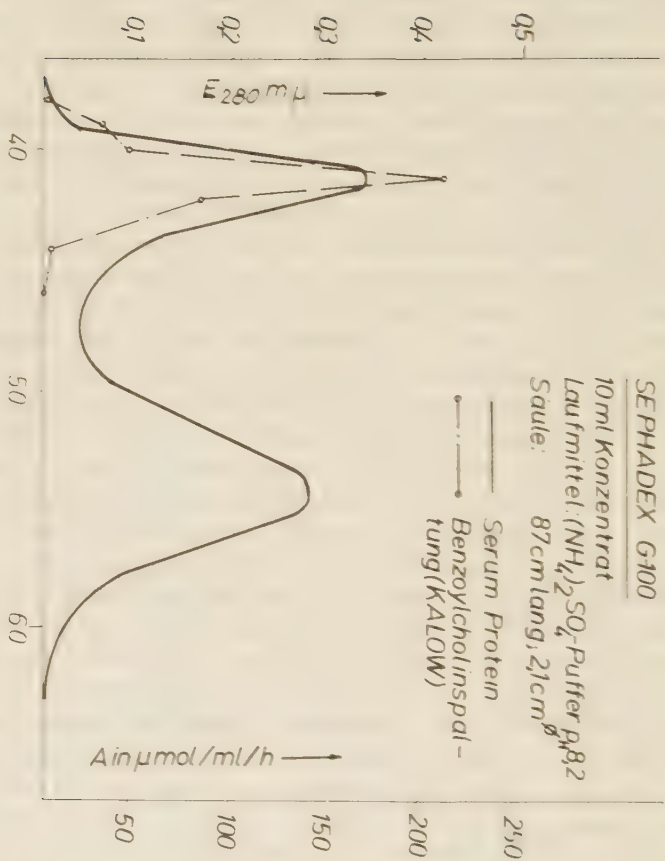
ABBILDUNG 6

Auftrennung von Enzymkonzentrat mit Sephadex G-75
Proben jeweils nur 2,0 ml

hier nur Fraktionen von 2,7 ml gewonnen. Die Abbildung zeigt eine klare Trennung und wiederum die Aktivität des Benzoylcholin spaltenden Enzyms nur im ersten Gipfel. Gleichzeitig konnte bei diesem Lauf gezeigt werden, daß auch im p_H -Bereich von 8,2 die Enzymaktivität nicht wesentlich beeinträchtigt wird.

Der nächste Versuch bestätigt die Ergebnisse der beiden vorhergehenden Versuche. Mit Sephadex G-100 (Trennbereich 1000 - 100 000) finden sich hier wieder zwei Peaks, wobei jetzt gesagt werden kann, daß die im Präparat vorhandenen Globuline wegen ihrer Molekulargröße noch gemeinsam nur durch das äußere Volumen laufen, während die Albumine bereits in einen Teil der Poren einzudringen vermögen und somit später und deutlicher getrennt eluiert werden. Die Enzymaktivität findet sich hier bei einem p_H des Elutionsmittels von 8,2 wiederum nur im "Globulinpeak" (Abbildung 7). Beim nächsten Lauf (Abbildung 8) wurde die Säule (Länge 100 cm, $\varnothing$ 24 mm) mit Sephadex G-200 (Trennbereich 1000 bis 200 000) gefüllt und mit 3 ml des Präparates beschickt. Als Elutionsmittel diente Sörensen-Phosphat-Puffer p_H 7,4, die einzelnen Fraktionen hatten 2,8 ml Inhalt. Neben der Bestimmung der Benzoylcholinesterase nach KALOW wurde in diesem Lauf auch die Aktivität der Acetylcholinesterase nach METCALF in sämtlichen Proben gemessen. Im Unterschied zu den vorhergehenden Versuchen ist hier zunächst ein dritter Eiweißgipfel zu sehen. Durch Erhöhung der Ausschlußgrenze auf ein Molekulargewicht von 200 000 wird nun auch der erste Peak der vorhergehenden Untersuchungen nochmals in zwei unterschiedliche Peaks aufgetrennt. Wie aus Voruntersuchungen über die Serumauftrennungen mit Sephadex G-200 bekannt ist, erscheinen im ersten Peak diejenigen Eiweißkörper, deren Molekulargewichte die Ausschlußgrenze wesentlich überschreiten. Es sind dies nach Untersuchungen von PORATH, FLODIN, KILLANDER, SCHUBERT, HESS (59, 17, 65, 30) vor allem gamma-1-Makroglobulin, beta-Lipoprotein und alpha-2-Globulin. Da es sich bei der aufgetrennten Substanz um bereits vorfraktioniertes Material handelt, in dem die gamma-Globuline völlig fehlen, verbleiben in diesem Fall für den ersten Peak nur beta-Lipoprotein und alpha-2-Makroglobulin. Im zweiten Gipfel, der von dem ersten deutlich abgesetzt ist, finden sich im Vollserum nach den Ergebnissen früherer Untersucher vor allem 7S-gamma-Globulin, beta-1-c-Globulin, beta-1-a-Globulin und geringe Teile des Albumins. Im Hinblick auf das Ausgangsmaterial fehlen in unserem Versuch wieder die gamma-Globuline. Im dritten Gipfel finden sich auch im Vollserum vor allem Albumine, daneben wegen ihrer geringen Molekulargröße auch alpha-1-Glukoprotein und beta-2-Glukoprotein.

Im Gegensatz zum Eiweiß, das nochmals aufgetrennt wird, findet sich die Aktivität des Benzoylcholin spaltenden Enzyms wieder nur im ersten Gipfel, wird also auch bei dem erhöhten Fraktionierungsbereich nicht in die Trennung einbe-



ABILDUNG 7
 Auftrennung von Enzymkonzentrat mit Sephadex G-100

zogen. Ob dieses Enzym ein einheitlicher Körper ist, läßt sich auch hier nicht sagen, da im Molekulargewichtsbereich über 200 000 durchaus eine weitere Auftrennung möglich ist, die aber mit dieser Methode nicht faßbar ist. Abzulesen ist hier lediglich, daß es nach unseren Untersuchungen kein Benzoylcholin spaltendes Enzym gibt, das ein Molekulargewicht unter 200 000 besitzt.

Anders verhält es sich mit der hier gleichzeitig untersuchten Acetylcholinspaltung. Neben einem ersten Aktivitätsmaximum im nicht fraktionierten Bereich, der mit der Benzoylcholinspaltung gleichläuft, sind hier auch in der Nähe des sogenannten "L-Peaks" (in Abbildung 8 Probe-Nr. 52-70) zwei deutlich voneinander getrennte Gipfel hoher Aktivität anzutreffen, wobei der erste noch vor dem Anstieg der Eiweißfraktion zu liegen kommt, der zweite im aufsteigenden Ast dieser Fraktion. Auch im Bereich des mittleren Eiweißgipfels ist noch ein kleinerer Aktivitätspeak zu sehen (Probe-Nr. 45-50). Bei der Acetylcholinhydrolyse im nicht fraktionierten Bereich ist eine gleichzeitige Spaltung durch dasselbe Enzym das auch Benzoylcholin spaltet, nicht auszuschließen. Bei dem zweiten und dritten Hauptgipfel findet jedoch keine Benzoylcholinhydrolyse statt, das heißt, daß das hier dargestellte Enzym mit der spezifischen Acetylcholinesterase identisch sein dürfte. Auffallend ist, daß mehrere voneinander getrennte Aktivitätsgipfel gefunden wurden.

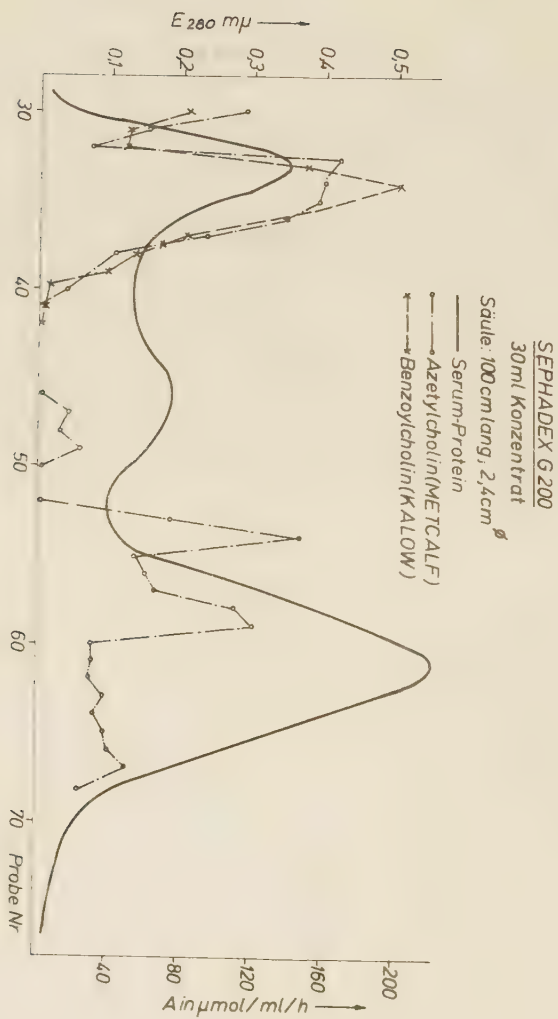


ABBILDUNG 8

Auftrennung von Enzymkonzentrat mit Sephadex G-200,
 Laufmittel: Soerensen-Phosphat-Puffer pH 7,4

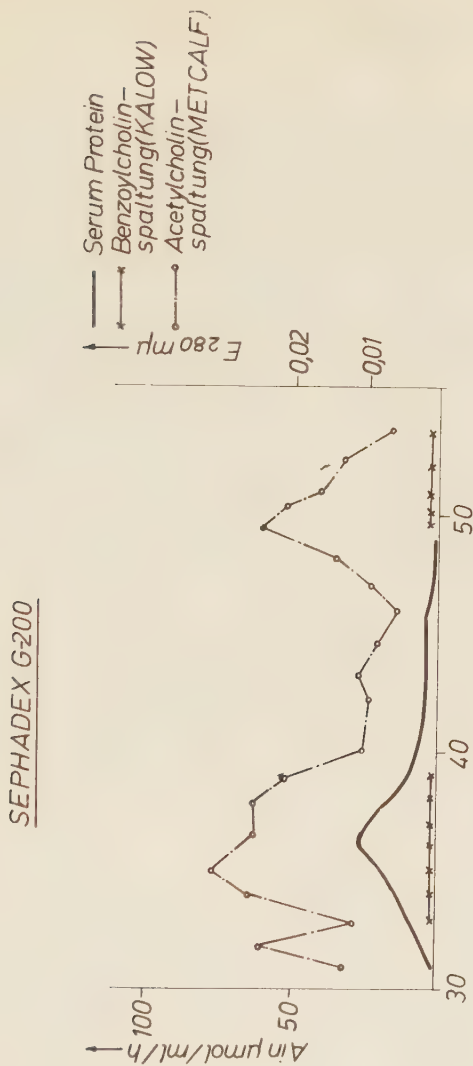


ABBILDUNG 9

Auftrennung von elektrophoretisch gewonnenen Albuminfraktionen mit Sephadex G-200: Keine Benzoylcholinspaltung, dagegen zwei deutlich voneinander getrennte Aktivitätsgipfel der Acetylcholinspaltung (Fraktion 30-40 und 46-53).

Gruppe II: Sephadex G-200:

Auftrennung von Vollserum.

Im ersten Versuch dieser Gruppe (Abbildung 9) wurden 1,5 ml Serum eines gesunden 35-jährigen Mannes mit Hilfe der Sephadex-G-200-Säule (Länge 100 cm, $\varnothing$ 22 mm) fraktioniert. Als Elutionsmittel diente Sörensen-Phosphat-Puffer p_H 7,4. Das Volumen der einzelnen Fraktionen betrug 5 ml.

Die Eiweißextinktionen bei 280μ zeigten das übliche Bild einer Auftrennung von Nativserum. Die Bestandteile der einzelnen Gipfel sind zur Genüge bekannt (siehe Methodik). Neu bei unseren Untersuchungen ist ein vierter Peak, der von den drei bekannten und beschriebenen Gipfeln (in Abbildung 9 Probe-Nr. 13-30) deutlich durch eine breite Zone ohne manifestierbares Eiweiß (Probe-Nr. 30-38) getrennt ist, dessen Maximum jedoch weit unter dem der vorhergehenden liegt. Wie bei den vorhergehenden Untersuchungen liegt das Benzoylcholin spaltende Enzym wieder außerhalb des fraktionierten Bereichs. Wie auch in den nächsten Versuchen festzustellen war, ließ sich das bei der trägerfreien Elektrophorese im Bereich der gamma-Globuline gefundene Isoenzym mit der Sephadex-Gel-Filtration nicht isoliert zur Darstellung bringen. Im Gegensatz dazu wird Acetylcholin von Enzymen unterschiedlicher Molekülgröße auch im Bereich zwischen 200 000 und 20 000 hydrolysiert. Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, finden sich drei Aktivitätsmaxima (Probe Nr. 15-22, 30-40, 41-50). Das erste im Bereich der M-Eiweißkörper, das zweite nach dem hauptsächlich Albumin enthaltenden L-Peak, das dritte im Größenbereich der kleinen Nachfraktionen. Die Bezeichnung der drei Peaks als "S" (schwere), "M" (mittlere) und "L" (leichte Eiweißkörper) ist von SCHUBERT und Mitarbeitern (65) eingeführt.

Ein viertes Maximum verläuft wieder kongruent mit der Benzoylcholinhydrolyse im Bereich der Makroglobuline.

Völlig neu bei diesem Versuch ist der Umstand, daß hier in einem Bereich des Elutionsdiagramms eine Enzymaktivität gegen Acetylcholin zu finden ist, in welchem die Eiweißextinktion bei 280μ nahe null ist. Daß es sich hier nicht um ein Artefakt handelt, beweist die Reproduzierbarkeit in den nächsten Versuchen. Das Co-Enzym dieses Acetylcholin spaltenden Ferments muß also aus einem Eiweißkörper bestehen, der bei 280μ im UV-Licht unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine Extinktion zeigt. Die Größe dieses Eiweißkörpers liegt unterhalb der der Albumine, also etwa im Bereich zwischen 50 000 und 20 000. Da ja die Fermenteiweiße im Serum zu den sogenannten "Spurenproteinen" zählen, ist es am wahrscheinlichsten, daß diese geringen Eiweißmengen des von den anderen Serumeiweißfraktionen abgetrennten Ferments durch die spektrophotometrische Methode noch nicht erfaßt werden.

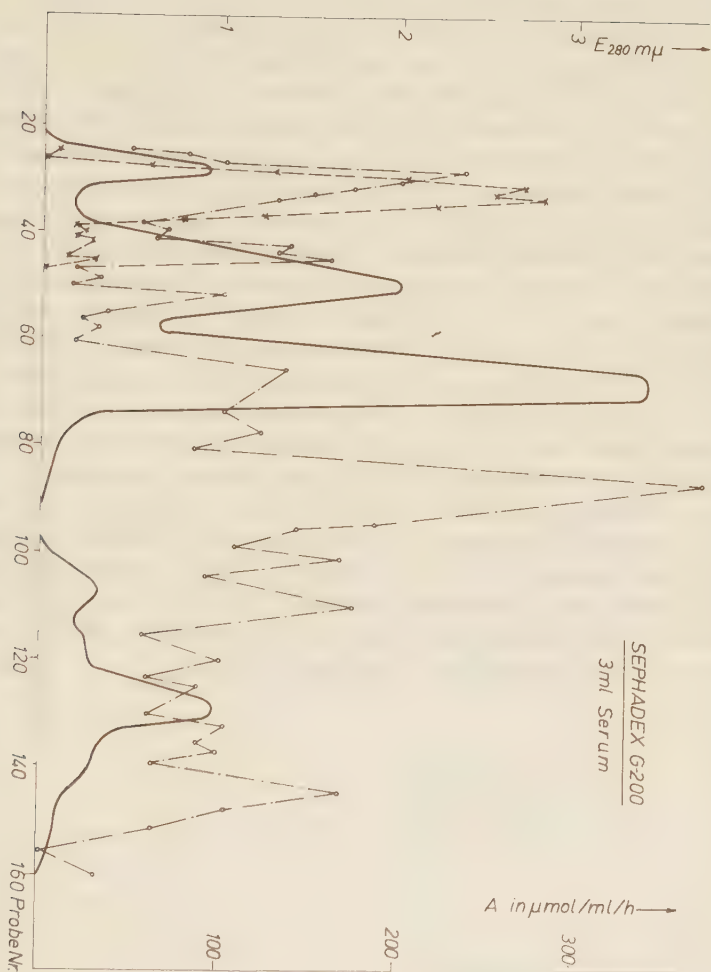


ABBILDUNG 10

Auftrennung von Gesamtserum nach vorheriger Fällung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15 %ig.

Wie aus den Untersuchungen mit der trägerfreien Elektrophorese bekannt war, findet sich in der Albuminfraktion im Elphorogramm eine Aktivität gegenüber Acetylcholin. Das Verhalten dieses Aktivitätspeaks wurde im Versuch der Abbildung 10 an der Säule studiert. Zu diesem Zweck wurden aus dem elektrophoretisch aufgetrennten Serum gesunder Versuchspersonen die Fraktionen der höchsten Extinktion im Albuminbereich herausgenommen und vereinigt. Diesem Albumin (insgesamt 16,5 ml) wurde festes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zu einer Konzentration von 32 % zugegeben. Der Niederschlag wurde nach 4 Stunden abzentrifugiert, in Sorensen-Phosphat-Puffer gelöst und damit die Sephadex-G-200-Säule beschickt. Auf der Abbildung ist zunächst eine einheitliche Eiweißkurve zu sehen, die dem hier isoliert dargestellten Albumin entspricht. Bei der Messung der Aktivitäten gegen Benzoylcholin und Acetylcholin findet sich, wie erwartet, keine Benzoylcholinesteraseaktivität. Dagegen zeigt die Acetylcholinhydrolyse wieder zwei deutlich getrennte Peaks, den ersten vor dem Albumingipfel (Probe-Nr. 30-40), den zweiten dagegen wiederum in einem eiweißarmen oder eiweißfreien Bereich (Probe-Nr. 46-53). In den nächsten Versuchen (Abbildung 12 und 13) wurden Gesamtseren gesunder Versuchspersonen mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällt (15 %ig bzw. 31 %ig). Bei sonst gleichen Versuchsbedingungen konnten auch hier die Ergebnisse reproduziert werden, wobei die höhere Konzentration des Fällungsmittels die bessere Trennung erbrachte. Wie die Abbildung 11 zeigt, ist auch bei kleineren Einzelfractionen eine weitere Auftrennung nicht möglich. Allerdings sind die einzelnen Peaks deutlicher voneinander getrennt. Es war dadurch möglich, sie zur weiteren Differenzierung genauer voneinander abzutrennen. Der OUCHTERLONY-Test ergab neben den bereits bekannten Bestandteilen in dem bei unseren Untersuchungen immer vorhandenen vierten Eiweißgipfel einwandfrei Albumin.

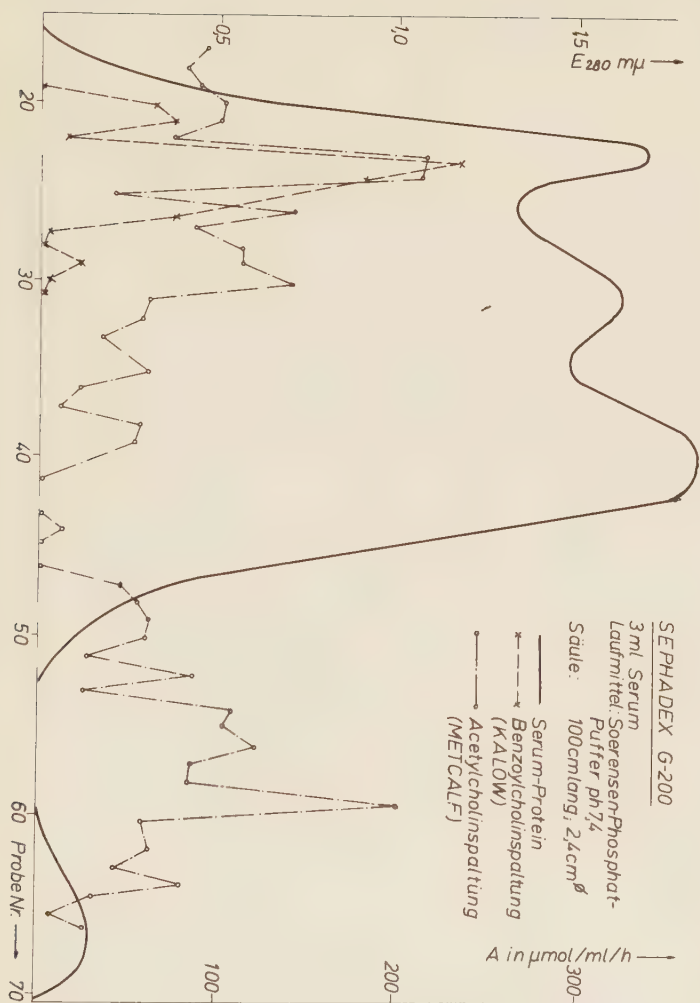


ABBILDUNG 11

Auftrennung von Gesamtserum nach vorheriger Fällung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 41 %ig.

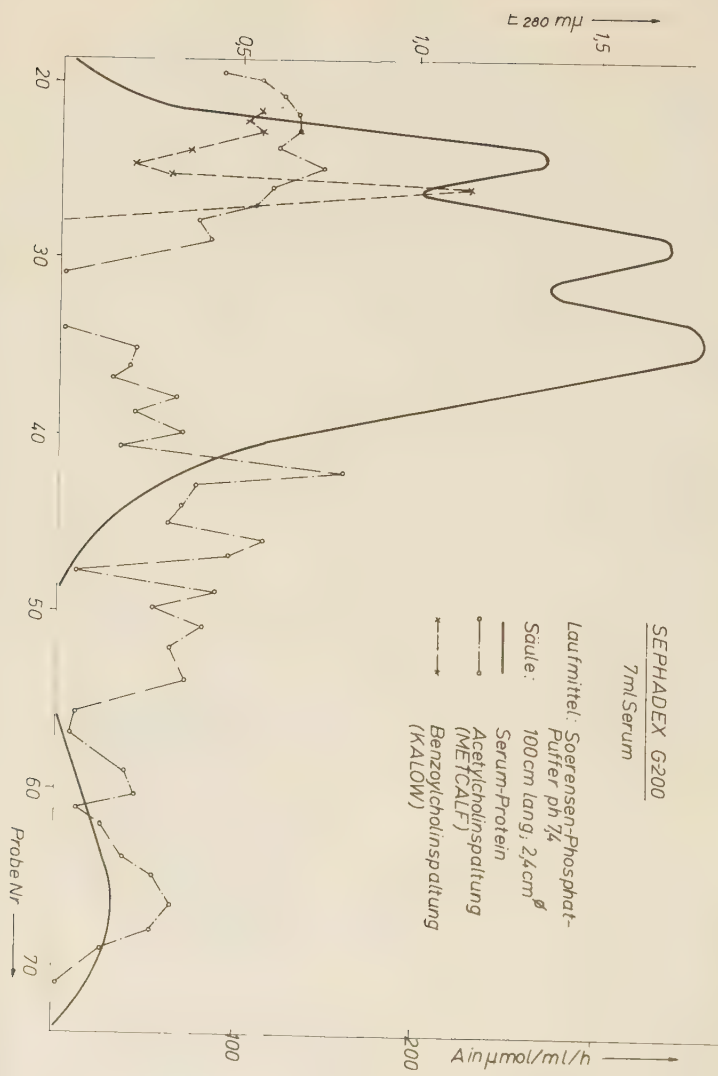


ABBILDUNG 12
Auftrennung von Gesamts Serum in kleinere Einzelfraktionen (2 ml).

DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe zweier neuerer Trennmethoden die Cholinesterasen des menschlichen Serums zu untersuchen und anhand der elektrostatischen Ladung und der Molekülgröße und -form zu definieren.

Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung:

Die Bemühungen um möglichst gereinigte Enzymfraktionen finden sich seit den ersten Anfängen der Cholinesteraseforschung (STEDMAN und EASSON (66), AUGUSTINSSON (5)). 1946 stellte COHN (10) fest, daß es möglich ist, mit Hilfe der Elektrophorese die Pseudocholinesterase zu 95 % in den alpha-2-Globulinen zu lokalisieren, zu 5 % in den Albuminen. Alle neueren Eiweißtrennmethoden wurden in der Folgezeit dazu benutzt, diese Enzyme darzustellen. Es war daher naheliegend, die von HANNIG (26) entwickelte, trägerfreie Elektrophorese ebenfalls zu diesem Zweck einzusetzen. Neben einer genaueren Auftrennung der einzelnen Serumweißkomponenten in 48 Fraktionen ist es bei dieser Methode von großem Vorteil, daß die einzelnen Fraktionen in beliebiger Menge, nur mit dem jeweiligen Puffer vermischt, voneinander getrennt gesammelt werden können. Wir fanden bei unseren Untersuchungen mit dieser trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese ein Aktivitätsmaximum der benzoylcholin-spaltenden Enzyme im Bereich zwischen den alpha-2-Globulinen und den beta-Globulinen. AUGUSTINSSON (7) fand mit der präparativen elektrophoretischen Säulenchromatographie (Verfahren nach FLODIN und KUPKE (16), Trägermaterial Zellulosepulver) im menschlichen Plasma neben einer hohen Aktivität im Albuminbereich ebenfalls in den alpha-2-Globulinen und beta-Globulinen eine "Butyrylcholinesterase" von niedriger Spezifität, die auch Benzoylcholin, Succinylcholin und andere Ester spaltete. Nachdem es sich um das gleiche Prinzip der Trennung (elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit) handelt, ist anzunehmen, daß diese unspezifische Butyrylcholinesterase mit der von uns gefundenen Enzymaktivität identisch ist. Bei den weiteren Auftrennungen war immer wieder im Bereich der gamma-Globuline eine geringe Aktivität meßbar. Bei diesen geringen Anstiegen liegt natürlich der Verdacht nahe, daß es sich um ein Kunstprodukt handelt. Bei der Empfindlichkeit des Substrates genügen schon geringe Schwankungen des pH -Wertes, um die Spontanhydrolyse zu vervielfachen. Die gemessenen pH -Werte sind jedoch in allen Fraktionen annähernd gleich. PILZ und HÖRLEIN (60) haben 1964 mit der von ihnen entwickelten Stärkebreielektrophorese im Serum zwei Gipfel einer unspezifischen Esterase zur Darstellung gebracht, die Benzoyl-

cholin, alpha-Naphthylpropionat und Tributyrin spalten, jedoch keine Wirkung gegenüber Acetylcholin zeigen. Die Zuordnung zu bestimmten Eiweißbestandteilen wird von diesen Autoren nicht gemacht. Allerdings kam bei ihren Untersuchungen nahe der Kathode eine Anhäufung von Enzymen zur Darstellung, die sowohl Benzoylcholin, als auch Acetylcholin spalteten. Bei unseren Untersuchungen wurde im Bereich der Benzoylcholinspaltung immer Acetylcholin gleichzeitig hydrolysiert, so auch in den gamma-Globulin-Fractionen. Dabei zeigte sich immer eine auffallende Kongruenz der einzelnen Aktivitätswerte. Eine isolierte Acetylcholinhydrolyse fanden wir mit der METCALFschen Methode im Bereich der Albumine, wie auch PILZ und HÖRLEIN (60), sowie AUGUSTINSON (7) bereits beschrieben hatten. In Übereinstimmung mit diesen Autoren stellten wir fest, daß sich im menschlichen Serum ein Enzym zur Darstellung bringen läßt, das analog zur spezifischen Acetylcholinesterase nur Acetylcholin spaltet. Die Deutung dieses spezifischen Enzyms stößt auf Schwierigkeiten, da es möglich ist, daß es sich um die bei der Aufbereitung des Serums aus den Erythrozytenmembranen freiwerdende "Erythrozytenacetylcholinesterase" handelt. Auch die sorgfältigste Behandlung des Untersuchungsmaterials schließt diese Möglichkeit nicht aus. Nach neueren Untersuchungen von PILZ (im Druck) läßt sich auch mit der Stärkebreielektrophorese dieses spezifische Enzym zwischen alpha-1- und alpha-2-Globulinen darstellen. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von PILZ und Mitarbeitern (60) kommen wir jedoch zu dem Ergebnis, daß die im Serum vorhandenen unspezifischen Benzoylcholinesterasen immer auch Acetylcholin mit der selben Aktivität zu spalten vermögen. Wir schließen daraus, daß es sich hier um eine unspezifische Cholinesterase handelt, die mehrere Substrate zu spalten vermag, vornehmlich jedoch Benzoylcholin und Butyrylcholin.

Ergebnisse der Gel-Filtration:

Die Auftrennung der einzelnen Cholinesterasegruppen war bis jetzt schon an Ionenaustauschsäulen versucht worden, hatte jedoch zu keinem befriedigenden Ergebnis geführt. ESTBORN (15) gelang es 1963 erstmals die Darstellung von Isoenzymen der Phosphatasen aus verschiedenen Gewebshomogenaten mittels einfacher Molekularsiebung mit Sephadex G-200. Mit dieser Methode haben nun auch wir versucht, die bereits gewonnenen Fraktionen mit Enzymaktivität noch weiter aufzutrennen. Die Chromatographie mit Ionenaustauschern verläuft ja im Grunde genommen nach einem ähnlichen Prinzip, wie die elektrophoretische Auftrennung, nämlich nach der Oberflächenladung des jeweiligen Moleküls. So waren mit einer weiteren Auftrennung mit DEAE-Sephadex keine neuen Gesichtspunkte zu erwarten. Anders verhält es sich bei der reinen Molekular-

siebung. Damit konnte eine gänzlich andere Art der Differenzierung herangezogen werden. Da bei dieser Methode die hochempfindlichen Proteine sehr milden Bedingungen ausgesetzt werden, scheint sie speziell für die Untersuchungen von Enzymen geeignet. HARRIS und ROBSON (29) hatten 1963 mit Sephadex G-200 vier verschiedene Serumcholinesterasekomponenten im Serum zur Darstellung gebracht. Dabei hatten sie zwar mit der KALOWschen Bestimmung auch nur im Bereich des ersten Peaks eine Aktivität gegen Benzoylcholin gefunden, während die übrigen Komponenten (C_1 , C_2 , C_3) mit alpha-Naphthylacetat zur Darstellung gebracht wurden. Unter dem Begriff der Serumcholinesterase wurden also Enzyme zusammengefaßt, die gegen unterschiedliche Substrate wirksam sind. Bei unseren ersten Versuchen war es bereits mit Sephadex G-100 möglich, die Albumine von den enzymaktiven Proteinen (Substrat Benzoylcholin) abzutrennen. Auch bei unseren weiteren Auftrennungen mit G-200 mit einer Ausschlußgrenze von 5 000 bis 200 000 verbleibt die Aktivität des Benzoylcholin spaltenden Enzyms außerhalb des Auftrennungsbereiches, das heißt, sein Molekulargewicht ist größer, als 200 000 ! ROTHENBERG und NACHMANSOHN (61) nahmen ursprünglich an, daß die Acetylcholinesterase ein Molekulargewicht von 3×10^6 habe. Wegen der hohen Wechselzahl von 20×10^6 Molekülen Acetylcholin / Minute / Molekül Acetylcholinesterase glaubten sie, daß dieses hochmolekulare Enzym 48 aktive Seitenketten habe. AUGUSTINSSON (6) vermutete jedoch, daß das von diesen Autoren gefundene großmolekulare Enzym eine Aggregation von kleineren aktiven Molekülen mit einem Molekulargewicht von 63 000 darstellt. Bei der Auftrennung des aus der Elektrophorese gewonnenen Präparates gelingt es mit der Molekularsiebung bereits nur noch Acetylcholin spaltende Enzyme von dem im elektrischen Feld noch gemeinsam in Erscheinung tretenden Aktivitätsgipfel abzusondern. Diese Enzyme finden sich ungefähr in der Größenordnung der Albumine (MG 69 000). Allerdings wird auch hier wieder im Bereich der Benzoylcholinspaltung Acetylcholin ebenfalls hydrolysiert. Leider ist eine weitere Auftrennung dieser hochmolekularen Enzyme mit der Gel-Filtration nicht möglich. Das zeigt sich auch bei den Auftrennungen von Vollserum. Benzoylcholin wird nur im Bereich der Makroglobuline hydrolysiert, im gesamten übrigen Bereich der Auftrennung wird Benzoylcholin nicht mehr gespalten. Die Acetylcholin spaltenden Enzyme sind jedoch durchaus nicht ein so einheitlicher Körper, wie PILZ und HÖRLEIN (60) es beschreiben, sondern bestehen, wie wir auch schon bei der trägerfreien Elektrophorese zeigen konnten, aus mehreren Eiweißkörpern mit unterschiedlichem strukturellem Aufbau hinsichtlich ihrer Molekulargröße und elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit. Wahrscheinlich handelt es sich um "Isoenzyme". AUGUSTINSSON (7) fand bei seinen Untersuchungen im Bereich der Albumine eine Hydrolyse von Phenylacetat, ebenfalls getrennt von der Benzoylcholinspaltung.

Es ist möglich, daß es sich dabei um das gleiche Enzym handelt, das im Bereich der Albumine selektiv auch in unseren elektrophoretischen Auftrennungen Acetylcholin spaltet. Bei der Gel-Filtration von Gesamtserum findet sich eine hohe Enzymaktivität gegen Acetylcholin nach den Albuminen, wobei in diesen Fraktionen wenigstens spektrophotometrisch kein Eiweiß nachzuweisen ist. Da das Enzymeiweiß ja vorhanden sein muß, scheinen nicht meßbare Mengen bereits zu genügen, um diese hohe Aktivität auszulösen. Bei der enorm hohen Wechselzahl der Acetylcholinesterase wird das verständlich. Auch bei den Untersuchungen ESTBORNS (15) über die Phosphatasen finden sich solche "eiweißnegativen" Zonen mit hoher Enzymaktivität. Somit scheint es mit dieser Methode möglich zu sein, ein Acetylcholin spaltendes Enzym von den übrigen Serumbestandteilen abzutrennen. Eine genauere Analyse dieser Fraktionen überstieg die uns zur Verfügung stehenden Mittel und Möglichkeiten.

Bereits ALLES und HAWES (1) haben 1940 festgestellt, daß die Cholinesterase des menschlichen Serums sich deutlich von der in den Erythrozyten unterscheidet. Auch WERLE (73) stellte 1943 nach eingehenden Untersuchungen in Frage, ob bei der Spaltung von verschiedensten Estern durch die Serumcholinesterase in allen Fällen dasselbe Ferment wirksam ist. RICHTER (62) hatte 1942 bei Hemmungs- und Trennversuchen ebenfalls herausgefunden, daß die Cholinesterase der roten Blutkörperchen ausschließlich Acetylcholin, nicht aber andere Cholinester spaltete. Die beiden durch Physostigmin hemmbaren Esterasegruppen wurden von MENDEL und RUDNEY (49) 1943 als "wahre" und "Pseudo-cholinesterase" bezeichnet. Weitere Untersuchungen zeigten immer offensichtlicher die Existenz mehrerer Typen von Cholinesterasen. 1955 warfen MENDEL und MYERS (51) die Frage auf, ob es im Serum eine Esterase gäbe, die Benzoylcholin bevorzugt spaltet. Eine gewisse Klärung dieser Probleme bringt das Vorhandensein von Isoenzymen.

Auf jeden Fall steht nach den bisherigen Untersuchungen fest, daß es nicht möglich ist, die Enzymeiweißkörper irgendeiner der nach herkömmlichen Methoden definierten Eiweißfraktionen des Serums sicher zuzuordnen. Es ist einleuchtend, daß z. B. bei der elektrophoretischen Auftrennung das jeweilige Enzym immer an derselben Stelle, im Bereich irgendeines Globulins oder des Albumins zu finden ist, da hierbei nur eine Eigenschaft des Enzymsymplexes, nämlich seine Oberflächenladung, maßgebend ist. Unter anderen Voraussetzungen, wie z. B. bei der Gel-Filtration oder bei der Ultrazentrifuge, erscheinen diese Enzyme, wie wir zeigen konnten, in gänzlich anderen Bereichen. Als Nachteil bei unseren Untersuchungen erwies sich, daß die Benzoylcholin spaltenden Enzyme die Ausschußgrenze des Sephadex G-200 überschreiten und somit einer weiteren Auftrennung mit dieser Methode nicht zugänglich sind. Dieses Verfahren ist da-

her, wie wir zeigen konnten, lediglich für die weitere Auftrennung und Isolierung Acetylcholin spaltender Enzyme geeignet.

Klinische Gesichtspunkte:

Die klinische Bedeutsamkeit dieser Enzymgruppen steht nach langjährigen Erfahrungen, die in einer großen Anzahl von Publikationen ihren Niederschlag gefunden hat, außer Frage (HOLLE 1949, HOLLE, STAHM, TEUFEL 1954, HOLLE 1958, HOLLE und DOENICKE 1961 (34, 35, 36, 37)). So war es nicht nur von theoretischem Interesse, die Eigenschaften dieser Enzymgruppe weiter aufzuklären.

Nach wie vor ist im klinischen Gebrauch der Begriff der "Serumcholinesterase" oder "Pseudocholinesterase" gängig. Es werden immer einfachere Methoden gefunden, mit deren Hilfe der Serumspiegel dieses Enzyms schnell und routinemäßig bestimmbar ist (SAILER und BRAUNSTEINER (64), LANG (43)). Gerade bei chronischen Leberleiden ist diese Aktivität eindeutig verändert und wird so zu einem brauchbaren Diagnostikum (GÜRTNER 1966 (23)). Eine Besonderheit gegenüber anderen Enzymbestimmungen besteht darin, daß bei krankhaften Veränderungen der Serumgehalt nicht vermehrt, sondern vermindert wird. Diese Tatsache erklärt sich daraus, daß hier nicht, wie z.B. bei den Transaminasen, durch Zugrundegehen von Parenchymzellen ein intrazellulär vorhandenes Enzym in die Blutbahn ausgeschwemmt wird, sondern daß die Produktionsstätte des Enzyms beeinträchtigt wird. Nach GÜRTNER und HOLLE 1965 (24) handelt es sich hierbei um die Mikrosomen, bzw. die Paladegranula des endoplasmatischen Reticulums, wo unter dem Einfluß der Kern-Ribonukleinsäuren ein Großteil der Eiweißsynthese (Albumine, alpha-2-Globuline, Prothrombin, Caeruloplasmin, Gerinnungsfaktoren) stattfindet. STEFFENELLI (67) fand bei seinen klinischen Untersuchungen eine Korrelation zwischen Albumingehalt und Cholinesteraseaktivität im Serum. Der gleiche Ursprungsort beider Stoffe, nämlich die Leberzelle, macht diese Befunde verständlich. Der Autor beschreibt aber auch eine erhöhte Cholinesteraseaktivität bei langer dauerndem Albuminverlust, z.B. bei der Lipoidnephrose: Dieser Befund läßt sich folgendermaßen erklären: Durch den niederen Albuminspiegel im Serum wird die Leberzelle zu erhöhter Produktivität angeregt. Die "aktivierte" Leberzelle produziert dabei nicht nur Albumin, sondern gleichzeitig Cholinesterasen. Während die Albumine durch den krankhaften Prozeß wieder verloren gehen, sind die Cholinesterasen des Serums (zumindest die Benzoylcholinesterase) wegen ihres wesentlich höheren Molekulargewichtes nicht "nierengängig" und werden daher im Serum angereichert.

Mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen wurde bisher versucht, für verschiedene

pathologische Vorgänge die Veränderungen der Cholinesteraseaktivität im Serum genauer zu definieren. Der Grund für die oft gegensätzlichen Ergebnisse liegt darin, daß bei den meisten Untersuchungen noch unterstellt wird, daß trotz unterschiedlicher Substrate nur eine "Cholinesterase" im Serum vorhanden ist. Dabei bleibt unberücksichtigt, daß allein der Herkunftsort der im Serum vorhandenen Cholinesterasen schon unterschiedlich ist. Eine erhöhte Acetylcholinesteraseaktivität weist z.B. auf einen vermehrten Erythrozytenzerfall hin, da gerade in den Membranen der Erythrozyten dieses Ferment lokalisiert ist. Damit könnte ein zeitweise beobachteter intraoperativer Anstieg der "Serumcholinesterase" erklärt werden, der von HOLLE und DOENICKE (37) beschrieben wurde. Wird in diesem Fall Acetylcholin als Substrat zur Bestimmung der "Serumcholinesterase" verwendet, so ist das Ergebnis bereits ungenau.

Die Bestimmung der Cholinesterasen ist seit Einführung des Succinylcholins als Muskelrelaxans in der modernen Narkose eine wichtige und unter Umständen lebensrettende Maßnahme. Zur Entdeckung der dafür wichtigen Enzymvarianten oder gar einer Aenzymie genügen präoperativ die bereits bekannten Bestimmungsmethoden vollauf. Als besonders geeignet erwies sich hier die Methode von KALOW und LINDSAY (40) mit der Bestimmung der Dibucainnummer. Wie McCOMB und Mitarbeiter 1964 (60) fanden, besteht bei den Cholinesterasevarianten eine Veränderung am sogenannten anionischen Rezeptor des Enzymmoleküls, da diese Varianten mit Ausnahme der positiv geladenen Cholinesterase alle nicht elektrisch geladenen Substrate mit der gleichen Intensität hydrolysieren, wie normale Cholinesterasen. Deshalb verhalten sich diese Varianten auch im elektrischen Feld anders, wie schon LIDELL, LEHMANN und Mitarbeiter (45) zeigen konnten.

Bei der Verwendung der bisherigen Methoden zur klinischen Diagnostik werden die Zusammenhänge zwischen Höhe der "Serumcholinesteraseaktivität" und bestimmten Erkrankungen bereits problematisch. Es wurde immer wieder versucht, Korrelationen herzustellen. Bei einigen pathologischen Prozessen, z.B. chronischen Lebererkrankungen, oder bei verschiedenen Arzneimittelwirkungen gelingt es bereits, klinisch verwertbare Beziehungen herzustellen. Eingehendere Differenzierungen und vor allem eine genaue Abgrenzung vom gesunden zum pathologischen Bereich sind bis jetzt noch nicht gelungen. Es wäre dazu unbedingt erforderlich, der komplexen Zusammensetzung der "Serumcholinesterase" auch in der praktischen Anwendung mehr Beachtung zu schenken. Wie bei den Transaminasen oder Phosphatasen wäre es mit großer Wahrscheinlichkeit auch möglich, durch gesonderte Bestimmung einzelner Cholinesterasen und deren Verhältnis zueinander hier weiter voranzukommen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die "Serumcholinesterasen" wurden mit Hilfe neuerer Trennmethoden im Vollserum und in einzelnen Serumfraktionen zur Darstellung gebracht. Zur Auftrennung des Serums diente die trägerfreie, kontinuierliche Elektrophorese (Auftrennung nach der Oberflächenladung) und die Sephadex-Gel-Filtration (Auftrennung nach der Molekülgröße). Die Enzymaktivitäten wurden nach KALOW/LINDSAY (Substrat Benzoylcholin) und HESTRIN/METCALF (Substrat Acetylcholin) spektrophotometrisch bestimmt.

Die experimentellen Untersuchungen erbrachten folgende Ergebnisse:

1. Die "Serumcholinesterase" oder "Pseudocholinesterase" besteht aus mehreren cholinesterspaltenden Enzymen.
2. Bei der elektrophoretischen Auftrennung finden sich folgende Hydrolyse-maxima: Im Albuminbereich reine Acetylcholin-spaltung, im Bereich der alpha-1-, alpha-2-, beta-1-Globuline Acetylcholin- und Benzoylcholin-spaltung und im Bereich der gamma-Globuline hauptsächlich Acetylcholin-spaltung bei nur geringer Benzoylcholinhydrolyse.
3. Bei der Auftrennung mit der Sephadex-Gel-Filtration findet sich im fraktionierten Bereich keine Aktivität gegen Benzoylcholin, weil diese Enzyme die Ausschlußgrenze von Sephadex-G-200 (MG bis 200 000) übersteigen. Für die Acetylcholinspaltung lassen sich jedoch drei deutlich voneinander getrennte Hauptbereiche darstellen, einer davon in einer fast eiweiß-freien Zone.
4. Als Nebenfund zeigt sich bei der Gelfiltration mit G-200 konstant ein vierter, noch nicht beschriebener Eiweißpeak (Albumin), in welchem auch Acetylcholin gespalten wird.
5. Für den klinischen Bereich ergibt sich die Folgerung, die einzelnen Komponenten der "Serumcholinesterase" für diagnostische Zwecke zu berücksichtigen.

Für das Entgegenkommen bei den Untersuchungen in seiner Klinik bin ich Herrn Professor Dr. F. HOLLE zu Dank verpflichtet.

Herrn Privat-Dozent Dr. Th. GÜRTNER danke ich für die Überlassung des Themas, für die Übernahme des Referates und für seine stete und freundliche Hilfe.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALLES, G. A. und R. C. HAWES:
Cholinesterases in the blood of man.
J. biol. Chem. 133, 375 (1940)
2. AMMON, R.: Die fermentative Spaltung des Acetylcholins.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1933)
3. AUGUSTINSSON, K. B. und D. NACHMANSOHN:
Distinction between acetylcholine-esterase and other choline-ester splitting enzymes.
Science 110, 98 (1949)
4. AUGUSTINSSON, K. B.:
Assay methods für cholinesterases.
Meth. biochem. Anal. 5, 1 (1957)
5. AUGUSTINSSON, K. B.:
Studies on blood choline esterase.
Ark. Kemi. Miner. Geol. 18A, 12 (1944)
6. AUGUSTINSSON, K. B.:
Substrate concentration and specificity of choline ester-splitting enzymes.
Arch. Biochem. 23, 111 (1949)
7. AUGUSTINSSON, K. B.:
Elektrophoresis studies on blood plasma esterases.
Acta chem. scand. 13, 571 (1959)
8. BARROLIER, J., E. WATZKE und H. GIBIAN:
Z. Naturforschung 13b, 754 (1958)
(zit. Behringwerk-Mitt. 43, 1964)
9. BREUER, H. und M. SCHÖNFELDER:
Untersuchungen über die Beteiligung der Cholinesterase und Acetylcholinesterase an der Spaltung von Acetylcholin im Serum.
Clin. chem. Acta (Amst.) 6, 515 (1961)
10. COHN, E. J., L. E. STRONG, W. L. HUGHES jr., D. L. MULFORD, J. ASHWORTH, M. MELININ und H. J. TAYLOR:
Preparation and properties of the serum and plasma proteins.
J. Amer. chem. Soc. 68, 459 (1946)

11. DALE, H. H.: The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine.
J. Pharm. Ex. Ther. 6, 147 (1914)
12. DOBRY, R. und R. FINN:
Science 127, 697 (1958)
(zit. Behringwerk-Mitt. 43, 1964)
13. DOENICKE, A., TH. GÜRTNER, G. KREUTZBERG, I. REMES, W. SPIESS und K. STEINBEREITHNER:
Serumcholinesterase Anenzymia.
Acta anaesth. scand. 7, 59 (1963)
14. DOENICKE, A. und ST. SCHMIDINGER:
Der diagnostische Wert der Serumcholinesterase-Bestimmung.
Med. Klin. 60, 2012 (1965)
15. ESTBORN, S.: Separation of phosphatase isoenzymes by gelfiltration.
Z. klin. Chem. 2, 53 (1964)
16. FLODIN, P.: Dextragels and their application in gelfiltration.
Diss. Arbeit 1962, Uppsala
17. FLODIN, P. und KILLANDER, J.:
Fractionation of human serum proteins by gelfiltration.
Biochim. biophys. Acta 63, 403 (1962)
18. FOLDES, F. F. und V. M. FOLDES:
Genetically determined hypersensitivity to hydrolysable agents used in anesthesia.
Proceedings 190, 1 (1962)
19. GELOTTE, B., FLODIN, P. und J. KILLANDER:
Fractionation of human plasma proteins by gel filtration and zone electrophoresis or ion-exchange chromatography.
Arch. Biochem. Biophys. Suppl. 1, 319 (1962)
20. GLICK, D.: A micro-method for the determination of choline esterase and the activity-pH relationship of this enzyme.
J. Gen. Physiol. 21, 289 (1938)
21. GOEDDE, H. W. und W. FUSS:
Differenzierung von Pseudocholinesterase-Varianten im Diffusionstest.
Klin. Wschr. 42, 286 (1964)

22. GRASSMANN, W. und K. HANNIG:
DBP 865399 vom 24.5.1949
23. GÜRTNER, TH.:
Über Differenzierung und Herkunft der Serumcholinesterase
des Menschen.
Habil. Schrift 1966
24. GÜRTNER, TH. und HOLLE, F.:
Über neuere Erkenntnisse der Hepatologie und ihre Bedeutung für die Leberdiagnostik in der Chirurgie.
Langenbeck's Arch. klin. Chir. 309, 224 (1965)
25. GÜRTNER, TH., G. KREUTZBERG und A. DOENICKE:
Comparative studies on Cholinesterase activity in serum and liver cells.
Acta anaesth. scand.: 7, 69 (1963)
26. HANNIG, K.: Die trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese und ihre Anwendung.
Z. analyt. Chem. 181, 244 (1961)
27. HARDEGG, W. und H. SCHAEFER:
Zur Kinetik der Cholinesterasen.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 255, 136 (1952)
28. HARRIS, H., D. A. HOPKINSON und E. B. ROBSON:
Nature 196, 1296 (1962)
29. HARRIS, H. und E. B. ROBSON:
Fractionation of human serum cholinesterase components by gel filtration.
Biochim. Biophys. Acta 73, 649 (1963)
30. HESS, A. R., R. W. ANGEL, K. D. BARRON und J. BERNSOHN:
Proteins and isozymes of esterases and cholinesterases from sera of different species.
Clin. chim. Acta (Amst.) 8, 656 (1963)
31. HESTRIN, S.: The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application.
J. Biol. Chem. 180, 249 (1949)
32. HITTORF, J. W.:
Poggendorff's annalen 89, 177 (1853)
(zit. Behringwerk-Mitt. 43, 1964)

33. HOFSTEE, B. H.:
Mechanism of action of bivalent metal ions and of phenothiazine derivatives on serum cholinesterase.
J. Pharm. Exp. Ther. 128, 299 (1960)
34. HOLLE, F.: Studien über das Verhalten der Serumcholinesteraseaktivität bei der Entzündung und Röntgenbestrahlung.
Z. ges. exp. Med. 115, 107 (1949)
35. HOLLE, F., K. H. STAHM und W. TEUFEL:
Die Bedeutung der Serumcholinesterasebestimmung für Chirurgie und Anästhesie.
Anaesthesist 3, 113 (1954)
36. HOLLE, F.: Bestimmung der Plasmacholinesteraseaktivität als prognostischer Test in der Chirurgie.
Langenbeck's Arch. klin. Chir. 289, 696 (1958)
37. HOLLE, F. und A. DOENICKE:
Cholinesterase in der Chirurgie.
Erg. Chir. Orthop. 43, 77 (1961)
38. KALOW, W. und R. O. DAVIES:
The activity of various esterase inhibitors towards atypical human serum cholinesterase.
Biochem. Pharmacol. 1, 183 (1958)
39. KALOW, W. und K. GENEST:
A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase.
Canad. J. Biochem. Physiol. 35, 339 (1957)
40. KALOW, W. und H. A. LINDSAY:
A comparison of optical and manometric methods for the assay of human serum cholinesterase.
Canad. J. Biochem. Physiol. 33, 568 (1955)
41. KALOW, W. und N. STARON:
Kinetic studies on the hydrolysis of benzoylcholine by human serum cholinesterase.
Canad. J. Biochem. Physiol. 34, 637 (1956)
42. KOELLE, G. B.: Cholinesterases of the tissues and sera of rabbits.
Biochem. J. 53, 217 (1953)

43. LANG, W.: Serumcholinesterase und Leberkrankheiten.
MMW 33, 1598 (1903)
44. LIDELL, J., H. LEHMANN und D. DAVIES:
Harris' and Whittaker's pseudocholinesterase variant with
increased resistance to fluoride.
Acta genet. (Basel) 13, 95 (1963)
45. LIDELL, J., H. LEHMANN, D. DAVIES und A. SHARIH:
Physical separation of pseudocholinesterase variants in hu-
man serum.
Lancet 463 (1962)
46. LIDELL, J., H. LEHMANN und E. SILK:
A silent pseudocholinesterase gene.
Nature 193, 561 (1962)
47. LOEWI, O. und HAVRATIL:
Über die hormonale Übertragbarkeit der Herzwirkung.
Pflüger's Arch. ges. Physiol. 214, 678 (1926)
48. MALSTRÖM, B. G., O. LEVIN, H. G. BOMAN:
Chromatography of human serum cholinesterase.
Acta chem. scand. 10, 1077 (1956)
49. MENDEL, B. und MUNDELL, D. B.:
Studies on cholinesterase.
Biochem. J. 37, 59 (1943)
50. MENDEL, B., D. B. MUNDELL and H. RUDNEY:
Cholinesterase III: Specific tests for true cholinesterase and
pseudocholinesterase.
Biochem. J. 37, 473 (1943)
51. MENDEL, B. and D. K. MYERS:
Identification of pseudocholinesterase in the tissues of
ruminants.
Nature 176, 783 (1955)
52. METCALF, R. L.:
The colorimetric microestimation of human blood cholin-
esterases and its application to poisoning by organic phos-
phate insecticides.
J. Econom. Entomol. 44, 883 (1951)

53. NACHMANSOHN, D. :
Die Rolle des Acetylcholins in den Elementarvorgängen der Nervenleitung.
Erg. Physiol. 48, 575 (1955)
54. NACHMANSOHN, D. und E. LEDERER:
Sur la biochimie de la cholinesterase.
Bull. Soc. Chim. Biol. 21, 797 (1939)
55. NACHMANSOHN, D. und I. B. WILSON:
in "Methods in Enzymology"
Acad. Press, New York 1955, Vol. 1, S. 642
56. NERNST, W.: Z. Elektrochemie, 3, 308 (1897)
(zit. Behringwerk-Mitt. 43, 1964)
57. PETERSON, E. A. und SOBER, H. A.:
J. Amer. Chem. Soc. 78, 751 (1956)
(zit. Behringwerk-Mitt. 43, 1964)
58. POCHET, A.: Mesures de l'activité cholinestérasiq~~ue~~^{ue}.
J. Pharm. Belg. 10, 339 (1955)
59. PORATH, J. und P. FLODIN:
Gel Filtration: A method for desalting and group separation.
Nature 183, 1657 (1959)
60. PILZ, W. und HÖRLEIN, H. :
Beitrag zur Kenntnis der Succinylcholinspaltung und deren möglicher Zusammenhang mit atypischen Serumesterasen.
Hoppe-Seylers Ztschr. physiol. Chem. 339, 157 (1964)
61. ROTHENBERG, M. A. und D. NACHMANSOHN:
Studies on cholinesterase III: Purification of the enzyme from electric tissue by fractional ammonium sulfate precipitation.
J. Biol. Chem. 168, 223 (1947)
62. RICHTER, D. und P. G. CROFT:
Blood esterases.
Biochem. J. 36, 746 (1942)
63. RUBINSTEIN, H. M., A. A. DIETZ, V. CZEBOTAR:
Unusual urinary compound in patients homozygous for hereditary atypical serum-cholinesterase.
Nature 202, 705 (1964)

64. SAILER, S. und H. BRAUNSTEINER:
Über eine neue, sehr einfache Methode zur Bestimmung der
Serumcholinesteraseaktivität und ihre klinische Bedeutung.
Klin. Wschr. 37, 986 (1959)
65. SCHUBERT, G., W. AUERSWALD, W. DOLESCHER und H. SCHUBERT:
Vergleich der Beurteilungsmöglichkeiten abnormer Plasma-
proteinverteilungen mittels molekularer Siebung, Sedimen-
talanalyse und elektrophoretischer Trennung.
Klin. Wschr. 43, 462 (1965)
66. STEDMAN, E. und L. H. EASSON:
Cholinesterase, an enzyme present in the blood serum of
horse.
Biochem. J. 26, 2056 (1932)
67. STEFFENELLI, N.:
Die Korrelation zwischen dem Albumingehalt und der
Cholinesteraseaktivität des Blutserums und ihre Beurteilung
bei Albuminverlust.
Klin. Wschr. 39, 1019 (1961)
68. STUMPF, C.: Methoden zur Bestimmung der Cholinesteraseaktivität im
Blut.
Z. Vitamin-, Hormon- und Fermentforschung 8, 36 (1956)
69. SURGENOR, D. M. und D. ELLIS:
Preparation and properties of serum and plasma proteins:
plasma cholinesterase.
J. Amer. Chem. Soc. 76, 6049 (1954)
70. SYNGE, R. L. M. und A. TISELIUS:
Biochem. J. 46 (1950)
(zit. Behringwerk-Mitt. 43, 1964)
71. TISELIUS, A.: Trans. Faraday Soc. 33, 524 (1937)
(zit. Behringwerk-Mitt. 43, 1964)
72. TURBA, F., FASOLD, G. und GUNDLACH, G.:
Tagung der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Heidelberg
1963
73. WERLE, E.: Die Cholinesterase.
Fermentforschung 17, 230 (1943)

74. WERLE, E. und H. UEBELMANN:
Zur Kenntnis des Blutegeltestes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. 189, 421 (1938)
75. WHITTAKER, V. P.:
Specifity, mode of action and distribution of cholinesterases.
Physiol. Rev. 31, 312 (1951)
76. WHITTAKER, V. P. und S. WIJESUNDERA:
The separation of esters of choline by filter-paper chromatography.
Biochem. J. 51, 348 (1952)

LEBENS LAUF

Am 31. Juli 1937 wurde ich als Sohn des Hauptlehrers Ludwig Balser und seiner Ehefrau Therese, geb. Braumiller, in München geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Kirchheim/Schwaben war ich von 1947 bis 1956 interner Schüler des Gymnasiums der Maristenschule in Mindelheim und legte dort 1956 die Reifeprüfung ab. Mein Medizinstudium begann ich im Wintersemester 1956/57 an der Universität München. Hier legte ich auch 1959 die ärztliche Vorprüfung und 1962 das medizinische Staatsexamen ab. Als Medizinalassistent war ich bis 1964 an folgenden Häusern tätig: Chirurgische Poliklinik der Universität München, Pathologisches Institut der Städtischen Krankenanstalten München-Schwabing, III. Medizinische Abteilung der Städtischen Krankenanstalten München-Schwabing, Gynäkologische Abteilung des Kreiskrankenhauses Fürstenfeldbruck. Am 15. August 1964 erhielt ich meine Approbation. Seit 15. August 1965 bin ich als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle wieder an der Chirurgischen Poliklinik der Universität München angestellt.

